



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**02.01.2003 Patentblatt 2003/01**

(51) Int Cl<sup>7</sup>: **C07K 16/18, G01N 33/561,  
G01N 33/539, G01N 33/577,  
G01N 33/541, G01N 33/68,  
G01N 33/50**

(21) Anmeldenummer: **01114192.6**

(22) Anmeldetag: **12.06.2001**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

- Dyrks, Thomas, c/o Schering Aktiengesellschaft  
13342 Berlin (DE)
- Mönning, Ursula, Dr., c/o Schering Aktiengesell.  
13342 Berlin (DE)

(71) Anmelder: **Wiltfang, Jens**  
**37120 Bovenden-Eddelgehausen (DE)**

(74) Vertreter: **Patentanwälte Rehberg + Hüppe**  
**Nikolausberger Weg 62**  
**37073 Göttingen (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Wiltfang, Jens, Dr.**  
**37120 Bovenden/Eddelgehausen (DE)**

(54) **Monoklonaler Antikörper, mAb 1E8, welcher für die zwei ersten N-terminalen Aminosäuren von Amyloid-beta-Peptiden spezifisch ist und dessen Verwendung zum Nachweis von Amyloid-beta Peptiden und/oder sAPPα**

(57) Ein monoklonaler Antikörper, der als mAb 1E8 bezeichnet wird, der bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, am 19.12.2000 hinterlegt wurde und

dem die DSMZ-Aufnahmenummer DSM ACC2485 zugeordnet wurde, ist zum Nachweis von Aβ-Peptiden Aβ1-x und Aβ2-x sowie von sAPPα verwendbar.

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf einen monoklonalen Antikörper und auf die Verwendung des Antikörpers zum Nachweis von A $\beta$ -Peptiden und/oder sAPP $\alpha$ . Dabei geht es insbesondere um die neurochemische Diagnostik neuropsychiatrischer Erkrankungen unter Betrachtung von A $\beta$ -Peptidkonzentrationen und hierbei wieder insbesondere um Demenzdiagnostik an Körperflüssigkeits- oder Gewebeproben.

[0002] Aus DE-Z: Psycho, 24 (1998), 726-731 ist es bekannt, dass bei Patienten mit Alzheimer Erkrankung erniedrigte Konzentrationen von A $\beta$ 1-42 im Liquor nachweisbar sind. Bei diesen Patienten gibt es auch eine Neigung zu einer Erhöhung bei der Konzentration von N-terminal modifizierten A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ x-42. Demgegenüber soll es keine Konzentrationsänderungen aufgrund einer Alzheimererkrankung bei dem A $\beta$ -Peptid A $\beta$ 1-40 geben. Die Konzentrationen der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-42 und A $\beta$ 1-40 im Liquor von Alzheimerpatienten sollen keine absolute Korrelation mit klinischen oder testpsychologischen Parametern des Schweregrads der Demenz zeigen, obwohl sie intraindividuell sehr konstant sein sollen.

[0003] Es sind Hinweise bekannt, dass auch sAPP $\alpha$  bei Alzheimer-Demenz im Liquor erniedrigt ist.

[0004] Um nähere Informationen über die Korrelation von Demenzerkrankungen und eventuell anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen mit der Konzentration aller oder bestimmter A $\beta$ -Peptide in Körperflüssigkeits- oder -gewebeproben zu gewinnen, muss ein Mittel bereitstehen, mit dem die Konzentrationen der A $\beta$ -Peptide sehr genau und reproduzierbar zu bestimmen sind, damit vorhandene Korrelationen nicht durch unvermeidliche Fehler bei den Konzentrationsbestimmungen verwischen.

[0005] Der Erfindung liegt daher die primäre Aufgabe zugrunde, ein Mittel zum genauen und reproduzierbaren Bestimmen von Konzentrationen von A $\beta$ -Peptiden in einer Körperflüssigkeits- oder -gewebeprobe bereitzustellen. Weiterhin geht es darum, die Anwendung dieses Mittels zu optimieren und aus den damit messbaren Korrelationen zwischen A $\beta$ -Peptidkonzentrationen und neuropsychiatrischen Erkrankungen Vorhersagen abzuleiten, die bei der zukünftigen neurochemischen Diagnostik neuropsychiatrischer Erkrankungen nutzbar sind.

[0006] Das Mittel, mit dem die Aufgabe der Erfindung gelöst wird, ist der monoklonale Antikörper, der als mAb 1E8 (Zellkultur UM 1998 clone 1E8) bezeichnet wird, der bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, am 19.12.2000 hinterlegt wurde und dem die DSMZ-Aufnahmenummer DSM ACC2485 zugeordnet wurde.

[0007] Der Antikörper mAb 1E8 kann radioaktiv markiert sein. Er ist aber auch in Verbindung mit einem sekundären Antikörper zu seiner Markierung verwendbar.

[0008] Es hat sich herausgestellt, dass der Antikörper mAb 1E8 mit hoher Selektivität und Spezifität an A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x sowie an lösliches  $\beta$ -Amyloidvorläuferprotein nach  $\alpha$ -Sekretaseschnitt (sAPP $\alpha$ ) anbindet. Damit ist die Voraussetzung geschaffen, dass die Konzentration dieser Peptide mit dem Antikörper mAb 1E8 bestimmbar ist.

[0009] Die Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 kann in einem Western-Immunoblot erfolgen. Dabei kann die effektive Selektivität des Antikörpers mAb 1E8 erhöht werden, indem vor dem Einsatz des Antikörpers unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockiermittel blockiert werden. Ein unter dem Handelsnamen "Roti-Block" erhältliches synthetisches Reagenz hat sich in diesem Zusammenhang gegenüber einer üblichen Verwendung von Milchpulver als Blockiermittel als sehr vorteilhaft herausgestellt, da es bei weitgehend erhaltener Selektivität die effektive Avidität - und damit Nachweisempfindlichkeit - des Antikörpers mAb 1E8 erhöht. Dies gilt nicht generell, da beispielsweise ein anderer kommerziell erhältlicher mAb (6E10) mit diesem Verfahren nicht kompatibel ist.

[0010] Da der Antikörper mAb 1E8 sowohl A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x als auch A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 2-x als auch sAPP $\alpha$  erkennt, müssen diese Peptide zum selektiven Nachweis voneinander getrennt werden. Dies ist durch eine Natrium-Laurylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) möglich. Bei einer herkömmlichen SDS-PAGE werden allerdings nur die A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und/oder A $\beta$ 2-x insgesamt von dem sAPP $\alpha$  abgetrennt, weil die effektiven Molekülgrößen der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und/oder A $\beta$ 2-x nicht hinreichend unterschiedlich sind. Durch Harnstoffzugabe und in zusätzlicher Abhängigkeit von Detergenzienkonzentration, Gelporengröße, pH-Wert und Temperatur kann jedoch eine aminosäureprimärspezifische Konformationsänderung der A $\beta$ -Peptide induziert werden, die die Lauflängen der carboxyterminal unterschiedlich langen A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x in der SDS-PAGE unterscheidbar macht. Diese Methode wird hier auch als A $\beta$ -SDS-PAGE bezeichnet. Von anderen in der jeweiligen Körperflüssigkeits- bzw. -gewebeprobe enthaltenen Substanzen können die A $\beta$ -Peptide zuvor durch isoelektrische Fokussierung in einer zu der Richtung der SDS-PAGE senkrechten Richtung separiert werden.

[0011] So kann unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, eine Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 bestimmt werden, von der bereits bekannt ist, dass absolute Erhöhungen im Hirnhomogenat und Erniedrigung im Liquor derselben beispielsweise in Korrelation mit Alzheimererkrankungen auftreten.

[0012] Unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 ist es aber auch möglich, eine Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat und Mischungen davon umfasst, auf das Vorliegen einer nachweisbaren Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 zu überprüfen. Eine solche Nachweisgrenze liegt bei 100 pg/ml oder höher.

Wenn sie überschritten wird, kann hieraus auf das Vorliegen einer Demenzerkrankung aus der Gruppe der Proteinfaltungskrankheiten bei dem Patienten, von dem die Probe stammt, geschlossen werden. Zur Gruppe der Proteinfaltungskrankheiten gehören neben der Alzheimerkrankheit die Lewy-Körperchen-Demenz und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Bei vielen Patienten mit diesen Krankheiten konnten hohe Konzentrationen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 in Liquorproben festgestellt werden.

[0013] Die Auswertung von Plasmaproben ist hier im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Verwendungen des Antikörpers mAb 1E8 schwierig, weil die Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 bereits im Liquor bei der Nachweisgrenze liegt, und die natürliche Konzentration der A $\beta$ -Peptide im Plasma deutlich niedriger ist als im Liquor. Um gleich hohe Konzentrationen in den Proben zu erhalten, muss daher im Plasma immer ein Aufkonzentrationsschritt, beispielsweise durch Immunopräzipitation mit dem Antikörper mAb 1E8, vor der eigentlichen Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden.

[0014] Als besonders signifikant für das Vorliegen einer Demenzerkrankung aus der Gruppe der Proteinfaltungskrankungen hat sich ein Anstieg im Verhältnis zwischen der Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 zu der Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 in der jeweiligen Probe herausgestellt. Bei diesen Demenzerkrankungen kommt es offensichtlich zu einem Vorgang, der die Erzeugung des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 zu Lasten der Erzeugung des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 fördert.

[0015] Die Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 erschließt noch weitere neurochemische Diagnosemöglichkeiten. So kann in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, mindestens ein Konzentrationsverhältnis bestimmt werden, das aus der Gruppe ausgewählt ist, welche ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40, ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 und ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40 umfasst. Den Bestimmungen dieser Konzentrationsverhältnisse liegt die neue Erkenntnis zugrunde, dass bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen signifikante Verschiebungen dieser relativen Konzentration an A $\beta$ -Peptiden gegenüber einem Vergleichspatientenkollektiv auftreten.

[0016] So kann beim Vergleichen des Konzentrationsquotienten A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40 mit einem vorgegebenen Grenzwert darauf geschlossen werden, dass beim Unterschreiten des Grenzwerts eine Alzheimererkrankung vorliegt. Dieser Grenzwert liegt im Liquor typischerweise zwischen 0,285 und 0,300. Diese Zahlenangaben beziehen sich wie alle weiteren Zahlenangaben, soweit im Einzelfall nichts anderes angegeben ist, auf Liquorproben, die nach ihrer Gewinnung jeweils einmalig zur Konservierung eingefroren wurden.

[0017] Umgekehrt kann beim Vergleichen dieses Konzentrationsquotienten A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40 mit einem anderen Grenzwert darauf geschlossen werden, dass beim Überschreiten eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems vorliegt. Dieser Grenzwert liegt im Liquor typischerweise zwischen 0,250 und 0,260. Er liegt damit zwar unterhalb des Grenzwerts, bei dessen Unterschreiten auf eine Alzheimer Krankheit geschlossen wird. Die Überschneidung ist aber nur gering. Dabei ist auch zu sehen, dass die hier getroffenen Diagnosen im Rahmen einer differenziellen Diagnostik zu sehen sind. So kann beim Überschreiten des Grenzwerts für die Alzheimererkrankung relativ sicher ausgeschlossen werden, dass eine solche Krankheit vorliegt. Umgekehrt kann beim Unterschreiten des Grenzwerts für eine chronische entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems darauf geschlossen werden, dass keine solche Erkrankung vorliegt.

[0018] Auch der Konzentrationsquotient A $\beta$ 1-42/ A $\beta$ 1-40 weist bei dem Unterschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts daraufhin, dass eine Alzheimererkrankung vorliegt. Hier liegt der Grenzwert im Liquor typischerweise zwischen 0,130 und 0,145.

[0019] Bei dem Konzentrationsquotienten 1-42/A $\beta$ 1-38 hat sich herausgestellt, dass dieser bei Erfüllung einer Ungleichung:

$$A \cdot A\beta 1-42 / A\beta 1-38 + B > A\beta 1-38 / A\beta 1-40$$

Zusammen mit dem Konzentrationsquotienten A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40 auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hinweist, wobei A und B Konstanten sind, für die im Liquor

$$0,2 < A < 0,8$$

und

$$0,5 \cdot A < B < 2 \cdot A$$

und

B &lt; 0,9

gilt.

Die bis hierher und nachfolgend beschriebenen neurochemischen Diagnosemöglichkeiten sind zwar unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 entwickelt worden. Sie sind aber genauso mit anderen Mitteln zum Bestimmen der Konzentrationen der einzelnen A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x umsetzbar. Hierbei kann es zu Verschiebungen der angegebenen Grenzwerte durch unterschiedliche Spezifitäten der Nachweismittel für die einzelnen A $\beta$ -Peptide relativ zu den Spezifitäten des Antikörpers mAb 1E8 kommen.

[0020] Neben den bislang angesprochenen Konzentrationsquotienten zwischen den Konzentrationen einzelner A $\beta$ -Peptide hat sich herausgestellt, dass relative Anteile einzelner A $\beta$ -Peptide an den insgesamt vorliegenden A $\beta$ -Peptiden ebenfalls diagnostisch in Bezug auf neuropsychiatrische Erkrankungen auswertbar sind. So kann in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, mindestens ein relativer Anteil A $\beta$ 1-n% einer Konzentration eines A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-n an einer Konzentration von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x bestimmt werden, wobei der relative Anteil A $\beta$ 1-n% aus der Gruppe ausgewählt ist, welche einen relativen Anteil A $\beta$ 1-42% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42, einen relativen Anteil A $\beta$ 1-40% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40 und einen relativen Anteil A $\beta$ 1-38% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 umfasst, und wobei die Konzentration von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x wenigstens die Konzentration der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 aus der Gruppe der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-37, A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 umfasst.

[0021] Mit dem Antikörper mAb 1E8 ist es bei geeigneter Verfahrensführung möglich, die Konzentrationen sämtlicher genannter A $\beta$ -Peptide neben diejenigen des sAPP $\alpha$  zu bestimmen. Die stärksten Konzentrationen werden bei den A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 festgestellt. Bei diesen A $\beta$ -Peptiden finden sich auch signifikante Änderungen der relativen Anteile beim Auftreten neuropsychiatrischer Erkrankungen. Wegen der Dominanz der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 reicht es dabei aus, die relativen Anteile in Bezug auf dieses Kollektiv der drei primär vorkommenden A $\beta$ -Peptide zu bestimmen. Es ist aber auch eine Berücksichtigung aller fünf oben genannten A $\beta$ -Peptide für die Bezugsgröße der relativen Anteile möglich und sinnvoll. Die Konzentrationen auf nur die drei hauptsächlich vorkommenden A $\beta$ -Peptide ermöglicht es auch, die hier beschriebene Diagnostik mit Hilfe anderer Verfahren zur Konzentrationsbestimmung durchzuführen. So können die Konzentrationen der drei A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 beispielsweise mit speziellen Essays für diese drei A $\beta$ -Peptide ermittelt werden.

[0022] Bei der Analyse des relativen Anteils A $\beta$ 1-38% hat sich herausgestellt, dass dieser beim Überschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts auf das Vorliegen einer chronischen entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems hinweist, wobei dieser vorgegebene Grenzwert typischerweise und bei Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 zur Konzentrationsbestimmung der A $\beta$ -Peptide im Liquor zwischen 15,0 und 15,7% liegt.

[0023] Bei der Analyse des relativen Anteils A $\beta$ 1-42% hat sich ergeben, dass ein Unterschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hinweist.

[0024] Dieser vorgegebene Grenzwert liegt zwischen 8 und 9%. Unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 zur Konzentrationsbestimmung der A $\beta$ -Peptide im Liquor kann er auf den Bereich 8,3 bis 8,8% eingegrenzt werden.

[0025] Gleichzeitig weist das Überschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts durch den relativen Anteil A $\beta$ 1-42% auf das Vorliegen einer chronischen entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems hin. Dieser Grenzwert liegt im Liquor zwischen 9,1 und 9,6%.

[0026] Der relative Anteil A $\beta$ 1-40% weist dann auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hin, wenn ein vorgegebener Grenzwert überschritten wird, der im Liquor typischerweise zwischen 59 und 61% liegt.

[0027] Es besteht eine positive Korrelation zwischen Schwere der Alzheimer-Demenz, abgebildet über den Minimal-Mental-Status Test (MMSE, 0-30 Punkte; 27-20: leichte Demenz; 19-11 Punkte: mittelschwere Demenz; 10-0 Punkte: schwere Demenz), und A $\beta$ 1-40%. Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-40%  $\geq$  60 haben im Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 15-16) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-40% < 60 (MMSE 19-20). Dagegen besteht eine negative Korrelation zwischen Schwere der Alzheimer-Demenz und A $\beta$ 1-38%. Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-38% < 17 haben im Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 14-15) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-38%  $\geq$  17 (MMSE 19-20).

[0028] Aufgrund der Beziehung (A $\beta$ 1-38% $\cdot$ ll & A $\beta$ 1-40% $\cdot$ ll = Schweregrad der Demenz ll) ist wie zu erwarten der Quotient A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40 negativ mit dem Schweregrad der Demenz korreliert. Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40 < 0,28 haben im Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 14-15) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A $\beta$ 1-38/A $\beta$ 1-40  $\geq$  0,28 (MMSE 19-20).

In der Anwendung des Antikörpers mAb 1E8 hat sich herausgestellt, dass für diesen Antikörper eine Fraktion der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x zugänglich ist, die von der Probenvorbereitung abhängig ist. Die nachweisbaren A $\beta$ -Konzentrationen könnten dadurch maximiert werden, dass die A $\beta$ -Peptide in den Proben durch eine Behandlung mit einem

Detergenz aufgeschlossen wurden. Bewährt hat sich hierzu eine SDS-Hitzedenaturierung.

[0029] In diesem Zusammenhang konnte weiter festgestellt werden, dass eine Kältekonserierung von Proben, die vor dem Aufschluss mit einem Detergenz erfolgt, die anschließend auch nach einem Aufschluss der Probe mit einem Detergenz bestimmbarer Konzentrationen von A $\beta$ -Peptiden reduziert. Hieraus lässt sich die Forderung ableiten, die Proben vor der Kältekonserierung und jeglicher anderer Kältebehandlung bereits der Probenbehandlung mit dem Detergenz zu unterwerfen.

[0030] Darüber hinaus hat sich ergeben, dass Teilmengen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42, die nach einer Kältebehandlung auch durch Aufschluss der Probe mit einem Detergenz nicht mehr dem Nachweis mit dem Antikörper mAb 1E8 zugänglich sind, bei Patienten mit und ohne Proteinfaltungserkrankungen unterschiedlich groß sind. Es gibt offensichtlich unterschiedliche Fraktionen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 in einer Probe, wobei diese Fraktionen unterschiedlich auf Kältebehandlungen und den Aufschluss mit einem Detergenz reagieren und gleichzeitig in ihren Konzentrationen mit dem Vorliegen von Proteinfaltungserkrankungen variieren. Das unterschiedliche Verhalten dieser Fraktionen gegenüber Kälte weist auf eine Kältepräzipitation hin, so dass auch andere Präzipitationstechniken zum Unterscheiden der beiden Fraktionen möglich sind.

[0031] So kann eine Probe in mindestens zwei Teilproben unterteilt werden, von denen eine erste Teilprobe der Probenbehandlung mit dem Detergenz vor oder statt einer Präzipitationsbehandlung unterworfen wird, während die zweite Teilprobe vor oder statt der Probenbehandlung mit dem Detergenz vorgenommen wird. Anschließend werden die in beiden Probenanteilen bestimmten Konzentrationen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 miteinander verglichen. Die erwähnte Präzipitationsbehandlung kann neben einer Kältebehandlung auch ein Immunoaffinitätsverfahren umfassen. Interessant ist es insbesondere, eine Differenz  $\Delta$ A $\beta$ 1-42 zwischen den in den beiden Probenanteilen bestimmten Konzentrationen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 zu ermitteln. Dieser Wert ist ein hochsignifikanter Hinweis auf das Vorliegen einer Proteinfaltungserkrankung.

[0032] In der praktischen Anwendung Antikörpers mAb 1E8 können die A $\beta$ -Peptide, an die der Antikörper mAb 1E8 gebunden ist, mit einem gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichteten sekundären Antikörper markiert werden. Der gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichtete sekundäre Antikörper kann bereits mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen sein oder nach seiner Immunreaktion mit dem Antikörper mAb 1E8 mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen werden.

[0033] Bei der mengenmäßigen Registrierung des Markers ist es bevorzugt, diese Registrierung photometrisch mit einer CCD-Kamera vorzunehmen, weil dieses Vorgehen eine sehr hohe Linearität zwischen dem Signal der CCD-Kamera und den registrierten Mengen des markierten Antikörpers mAb 1E8 gewährleistet.

[0034] Der neue Antikörper ist neben den bisher beschriebenen Diagnosemöglichkeiten auch zum reinen Aufkonzentrieren von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x und/oder A $\beta$ 1-x und/oder A $\beta$ 2-x und/oder sAPP $\alpha$  geeignet.

[0035] Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ergibt sich bei der Unterscheidung von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ n-x mit n > 2, da der Antikörper mAb 1E8 eine ausgeprägte N-terminale Spezifität aufweist und an A $\beta$ -Peptide A $\beta$ n-x mit n > 2 deutlich geringer anbindet (< 5%), wenn er unter den spezifischen Bedingungen des A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot eingesetzt wird.

[0036] Die Erfindung wird im Folgenden durch eine Charakterisierung und eine Beschreibung eines Verfahrens zur Herstellung des Antikörpers mAb 1E8 sowie in Form einer Beschreibung von Anwendungen des Antikörpers mAb 1E8 näher erläutert und beschrieben.

[0037] In den beigefügten Figuren zeigt:

Fig. 1: ein Flußdiagramm der Patientenkollektive, bei denen A $\beta$ -Peptide mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot im Liquor oder Plasma gemessen wurden. Die einfach umrahmten Patientenkollektive sind Teilmengen ihrer doppelt umrahmten Obergruppen. Einige Patienten befinden sich gleichzeitig in mehreren Kollektiven (vergl. Tabellen 5a-d) Die NDC-3 Untergruppen IP-Plasma-3 (n=5), IP-CSF-3 (n=5) und SDS-CSF-3 (n=5) sind nicht aufgeführt (vergl. 2.9.1).

Fig. 2: einen A $\beta$ -IPG-2D-PAGE/Immunoblot-2 (Panel A, C) und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 (Panel B) von synthetischen A $\beta$ -Peptiden, humanem Liquor und Liquor mit Zusatz synthetischer A $\beta$ -Peptide.

Fig. 3: eine Bestimmung von A $\beta$ -Peptiden im Liquor bei NDC-3 mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und ein Vergleich zwischen Trenngel mit (Panel A) und ohne Hamstoff (Panel B). Dabei gilt für die Spalten 1 bis 8: 10  $\mu$ l Liquor pro Patient. Der Liquor wurde nativ eingefroren und anschließend SDS-/hitzedenaturiert. Für die Spalten a bis e gilt: Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (Verdünnungsreihe).

Fig. 4: eine Auftragung von A $\beta$ 1-42 im Liquor bei den Patientenkollektiven NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung.

Fig. 5: eine Auftragung des Quotienten  $A\beta 1-42/A\beta 1-40$  im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung.

Fig. 6: eine Auftragung des Quotienten  $A\beta 1-42/A\beta 1-38$  im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung.

Fig. 7: eine Auftragung von  $A\beta 1-42$  im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) und  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung.

Fig. 8: eine Auftragung von  $A\beta$ -Peptidkonzentrationen, bestimmt mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3.

Fig. 9: eine Auftragung von  $A\beta$ -Peptidkonzentrationen, bestimmt mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 im Liquor bei Patienten der Gruppen OND-3 und AD-3 mit ein oder zwei ApoE  $\epsilon 4$  Allelen (AD-3 $\epsilon 4$ plus, OND-3 $\epsilon 4$ plus), im Vergleich zu OND-3 Patienten ohne ApoE  $\epsilon 4$  Allel (OND-3minus).

Fig. 10: eine Korrelation von  $A\beta$ -38 und  $A\beta 1-40$  im Liquor bei NDC-3 und eine Korrelationsmatrix der  $A\beta$ -Peptide.

Fig. 11: eine Auftragung von  $A\beta 1-38\%$  über  $A\beta 1-40\%$  im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A\beta 1-38\% = 15.5$ ,  $A\beta 1-42\% = 9.6$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert.

Fig. 12: eine Auftragung von  $A\beta 1-40\%$  über  $A\beta 1-42\%$  im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A\beta 40\% = 63.0$ ,  $A\beta 42\% = 8.5$ ) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert.

Fig. 13: eine Auftragung von  $A\beta 1-40\%$  über  $A\beta 1-38\%$  im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A\beta 38\% = 15.5$ ,  $A\beta 40\% = 60.0$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Die unterbrochenen Grenzwertlinien ( $A\beta 38\% = 16.0$ ,  $A\beta 40\% = 63.0$ ) kennzeichnen AD-3 Patienten mit schwerer Demenz. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert.

Fig. 14: einen Box-Plot der MMSE Testergebnisse im Liquor bei AD-3 in Abhängigkeit von den prozentualen  $A\beta$ -Peptidanteilen an der  $A\beta$ -Peptidgesamtkonzentration.

Fig. 15: MMSE Testergebnis in Abhängigkeit des prozentualen  $A\beta$ -Peptidanteils im Liquor an der  $A\beta$ -Peptidgesamtkonzentration bei AD-3.

Fig. 16: eine Auftragung von  $A\beta 1-38/A\beta 1-40$  über  $A\beta 1-42/A\beta 1-38$  im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. Die gestrichelte Grenzwertlinie ist eine Parallele zur Regressionsgeraden. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A\beta 1-38/A\beta 1-40 = 0.26$ ,  $A\beta 1-42/A\beta 1-38 = 0.57$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert.

Fig. 17: eine Auftragung von  $A\beta 1-38/A\beta 1-40$  über  $A\beta 1-42/A\beta 1-40$  im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A\beta 1-38/A\beta 1-40 = 0.26$ ,  $A\beta 1-42/A\beta 1-40 = 0.16$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert.

Fig. 18: einen Box-Plot der MMSE Testergebnisse im Liquor bei AD-3 in Abhängigkeit des Quotienten  $A\beta 1-38/A\beta 1-40$ .

Fig. 19: eine Auftragung von  $A\beta 1-42$  nativ im Liquor bei NDC-3KP und AD-3KP über  $\Delta A\beta 1-42\%$ , d.h. in Abhängigkeit von der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von  $A\beta 1-42$ . Die Grenzwertlinien ( $A\beta 1-42 = 2100$ ,  $\Delta A\beta 1-42\% = -17$ ) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3KP. Die Nullachse, d.h. keine kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von  $A\beta 1-42$ , ist durch eine Linie gekennzeichnet. Der ApoE-Genotyp wird für die NDC-3KP Patienten

angegeben. 9/11 AD-3KP Patienten hatten mindestens ein ApoE  $\epsilon$ 4 Allel. Für 2/11 AD-3KP Patienten lag der ApoE  $\epsilon$ 4 Genotypus nicht vor.

**Fig. 20:** eine Auftragung von A $\beta$ 1-42SDS im Liquor bei NDC-3KP und AD-3KP in Abhängigkeit von  $\Delta$ A $\beta$ 1-42%, d.h. in Abhängigkeit von der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von A $\beta$ 1-42. Die Grenzwertlinien (A $\beta$ 1-42 = 2100,  $\Delta$ A $\beta$ 1-42% = -17) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3KP. Die Nullachse, d.h. keine kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von A $\beta$ 1-42, ist durch eine Linie gekennzeichnet. Der ApoE-Genotyp wird für die NDC-3KP Patienten angegeben. 9/11 AD-3KP Patienten hatten mindestens ein ApoE  $\epsilon$ 4 Allel. Für 2/11 AD-4 Patienten lag der ApoE  $\epsilon$ 4 Genotypus nicht vor.

**Fig. 21a:** einen A $\beta$ -SDS-PAGE/mimnoblott-2: Immunopräzipitate (RIPA-IP, mAb 1E8) RIPA-löslicher A $\beta$ -Peptide aus Homogenaten von temporalem Kortex bei AD im Vergleich mit frontotemporaler Demenz (FTD). Auftragsvolumen 4  $\mu$ l. In den Spalten a bis c: Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (Verdünnungsreihe). In den Spalten 1 bis 4 und 5: temporaler Kortex bei AD. (\* Das Immunopräzipitat bei AD wurde bei einigen Patienten zwanzigfach verdünnt.) In den Spalten 8 bis 10: temporaler Kortex bei FTD.

**Fig. 21b:** einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblott-2: Immunopräzipitate (RIPA-IP, mAb 1E8) RIPA-löslicher A $\beta$ -Peptide aus Homogenaten von temporalem Kortex bei AD im Vergleich mit frontotemporaler Demenz (FTD), Lewy-Körperchen Demenz (LBD) und Kontrollpatient ohne Demenz (NDC). Auftragsvolumen 4  $\mu$ l. In den Spalten

a bis d: Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (Verdünnungsreihe)  
 5 und 6: temporaler Kortex bei AD  
 11 und 12: temporaler Kortex bei FTD  
 13 bis 15: temporaler Kortex bei LBD;  
 (13) LBD CERAD A, (14) LBD CERAD C, (15) LBD CERAD C  
 16: temporaler Kortex bei NDC

\* Das Immunopräzipitat bei AD wurde bei einigen Patienten zwanzigfach verdünnt.

**Fig. 22:** einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblott-2: Immunopräzipitate (mAb 1E8) RIPA-löslicher A $\beta$ -Peptide bei AD aus Hirnhomogenaten unterschiedlicher Hirnregionen. Intraindividuell Vergleich von Cerebellum und temporalem Kortex. Auftragsvolumen 4  $\mu$ l. In den Spalten:

a bis c: Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (Verdünnungsreihe)  
 1 bis 7: Cerebellum  
 1\* bis 7\*: temporaler Kortex, \* Immunopräzipitate zwanzigfach verdünnt

**Fig. 23a:** einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblott-2, in dem vergleichend zu einem Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (1) dargestellt sind: (2) SDS-/Hitzedenaturierte Zellkulturüberstände von humanAPP751Sw transgenen H4 Neurogliaoma Zellen (Auftragsvolumen 4  $\mu$ l), (3) 10  $\mu$ l Liquor eines NDC Patienten und (4) 10  $\mu$ l Liquor eines AD Patienten.

**Fig. 23b:** einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblott-2 in dem vergleichend zu einem Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide (1) die Immunopräzipitate (mAb 1E8) RIPA-löslicher A $\beta$ -Peptide folgender Hirnhomogenate dargestellt sind:

(2) temporaler Kortex bei AD  
 (3) temporaler Kortex bei frontotemporaler Demenz  
 (4) temporaler Kortex, Kontrollpatient ohne Demenz

\* Das Immunopräzipitat bei AD wurde zwanzigfach verdünnt.

**Fig. 24:** drei A $\beta$ -IPG-2D-PAGE/Immunoblots-2:

oben: eine zweidimensionale Auftrennung synthetischer A $\beta$ -Peptide. Durch die N-terminale Verkürzung um Aspartat wird der Isoelektrische Punkt (Ip) um eine pH-Einheit basischer. Mitte: Immunopräzipitation (mAb 1E8) und zweidimensionale Auftrennung von Liquor eines Patienten mit AD, der in der A $\beta$ -SDS-PAGE die Bande mit dem Rf-Wert für A $\beta$ 2-42 zeigte. unten: Immunopräzipitation (mAb 1E8) RIPA-löslicher A $\beta$ -Peptide und zweidimensionale Auftrennung aus dem temporalen Kortex bei AD. Die Bande mit dem Rf-Wert für A $\beta$ 2-42 in der A $\beta$ -SDS-PAGE wird auch zweidimensional als A $\beta$ 2-42 identifiziert.

Fig. 25a: einen A $\beta$ -SDS-AGE/Immunoblot-2 von A $\beta$ -Peptiden im Liquor vom Meerschweinchen. Der Liquor wurde vor dem Einfrieren SDS-/Hitzedenaturiert. In den Spalten:

- 1 bis 3: 10  $\mu$ l Liquor von Meerschweinchen 1,2 und 3  
a bis d: Verdünnungsreihe synthetischer A $\beta$ -Peptide.

Fig. 25b: einen A $\beta$ -SDS-AGE/Immunoblot-2 von A $\beta$ -Peptiden im Liquor vom Kaninchen. Der Liquor wurde vor dem Einfrieren SDS-/Hitzedenaturiert. In den Spalten:

- 1 bis 3: 10  $\mu$ l Liquor  
a: synthetische A $\beta$ -Peptide.

Fig. 26: einen A $\beta$ -SDS-AGE/Immunoblot-2 von hippokampalen Gewebeschnitten mit Kurzzeitkultur (0-8h) vom adulten Meerschweinchen. Jeweils zwei Gewebeschnitte (Dicke 500  $\mu$ m) wurden gepoolt, in Anwesenheit von RIPA Detergentien homogenisiert und immunopräzipitiert (mAb 1E8). Die zugehörigen Kulturüberstände (2 x 500  $\mu$ l) wurden ebenfalls gepoolt und in Anwesenheit von RIPA immunopräzipitiert (mAb 1E8). In den Spalten: 0 bis 8, intrazellulär: Zeitverlauf der intrazellulären Konzentration von A $\beta$ -Peptiden im hippokampalen Gewebeschnitt unmittelbar nach Gewinnung (0) bis zu acht Stunden (8; Doppelmessung) in Kurzzeitkultur.

- 1 bis 8, Überstände: Zeitverlauf der in die Kulturüberstände freigesetzten A $\beta$ -Peptide.  
synth. A $\beta$ : synthetisches A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42

Fig. 27: zwei A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblots-2, die eine Behandlung einer human751APPSw trangen H4 Neurogloma Zelllinie mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren (23a) und einen dosisabhängigen Effekt von Calpaininhibitor-1 (23b) zeigen. Die freigesetzten A $\beta$ -Peptide wurden in jeweils 4  $\mu$ l SDS-/Hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert (vergl. Fig. 23a,b). Vergleichend wurde die sAPP $\alpha$  Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Im Panel a ist: (1) DMSO-Kontrolle; (2) 50  $\mu$ M Calpaininhibitor-1; (3) 100  $\mu$ M Calpaininhibitor-3; (4) 5  $\mu$ M MG132; (5) 25  $\mu$ M Calteptin; (a-d) Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide.

Im Panel b ist: (1,1\*) DMSO-Kontrolle; (2,2\*) 12.5  $\mu$ M Calpaininhibitor-1; (3,3\*) 25  $\mu$ M Calpaininhibitor-1; (4,4\*) 50  $\mu$ M Calpaininhibitor-1; (a-e) Mix synthetischer A $\beta$ -Peptide; \* Doppelbestimmung.

Fig. 28a: einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2, der eine Behandlung einer humanAPP751Sw trangen H4 Neurogloma Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calpaininhibitor-1 zeigt (vergl. Fig. 23b). Die freigesetzten A $\beta$ -Peptide wurden in jeweils 4  $\mu$ l SDS-/Hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert. Vergleichend zur DMSO-Kontrolle wurde dosisabhängig der Effekt von Calpaininhibitor-1 auf die A $\beta$ -Peptidkonzentration im Überstand untersucht.

Fig. 28b: einen A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2, der eine Behandlung einer humanAPP751Sw trangen H4 Neurogloma Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calpaininhibitor-1 zeigt (vergl. Fig. 23b). Die freigesetzten A $\beta$ -Peptide wurden in jeweils 4  $\mu$ l SDS-/Hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert. Vergleichend zur DMSO-Kontrolle wurde dosisabhängig der Effekt von Calpaininhibitor-1 auf den prozentualen Anteil einer A $\beta$ -Peptidspecies an der A $\beta$ -Peptidgesamtkonzentration untersucht.

[0038] Weiterhin sind 21 Tabellen beigelegt.

#### 0 Herstellung des monoklonalen anti A $\beta$ -Antikörpers 1E8

[0039] Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers mAb 1E8 erfolgte in Auftrag der Schering AG bei der Auftragsfirma "nano Tools Antikörpertechnik" in Denzlingen nach deren Standardverfahren. Die Erstellung der Immunisierungs- und Screening-Strategie erfolgte in Absprache mit der Schering AG.

[0040] Kurzbeschreibung: Zur Immunisierung Balb/c Mäusen wurde das gesamte A $\beta$  Protein (1-42) eingesetzt (10  $\mu$ g/Immunisierung). Es erfolgte eine Primärimmunisierung sowie 3 sich anschließende Booster-Immunisierungen. Die Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils 2 Wochen. Danach wurde das Tier getötet und die Milz zur Zellfusion mit einer Maus-Myelomzelllinie eingesetzt. Die fusionierten Zellen wurden auf 96-Loch-Gewebekulturplatten übertragen und in Gegenwart von Feeder-Makrophagen kultiviert.

[0041] Zur Identifizierung der N-terminal spezifischen Antikörper wurden das Peptid 1-16 kovalent an entsprechend aktivierte ELISA-Platten gekoppelt und für das Screening mit den Hybridomzellüberständen eingesetzt. Die A $\beta$  1-16-po-

sitiven Klone wurden danach rekloniert und wiederholt getestet. Nach Expansion der Klone erfolgte die Cryo-Konservierung. Die Anreicherung des Antikörpers wurde mit Hilfe der Ionenaustauscherschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

[0042] Zur Eingrenzung der Spezifität des Antikörpers wurde ein Epitop-Mapping aus Cellulosegebundenen linearen Peptiden vorgenommen (Spotsynthese). Dazu wurde die Primärsequenz von A $\beta$  als Serie überlappender Peptide in Form von "Spots" auf einer Cellulosemembran synthetisiert und die Membran analog zum Western-Blot-Verfahren mit den monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die Detektion spezifisch-gebundener Antikörper erfolgte mit einem Sekundärantikörper.

[0043] Die Analyse ergab, dass der Antikörper 1E8, der Subklasse IgG1 kappa zugehörig, ein N-terminales lineares Epitop detektiert, das aus den ersten 8 N-terminalen Aminosäuren der A $\beta$ -Sequenz ausbildet wird. Dieser Antikörper erwies sich in nachfolgenden Experimenten als geeignet für den Nachweis von nativem A $\beta$  im Western Bot, Immunpräzipitation, Immunohistochemie und ELISA.

## 1 Übersicht

### 1.1 Beschreibung der Methodik

[0044] Es wird eine Natrium-Laurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für die Auftrennung des  $\beta$ -Amyloidvorläuferproteins (APP) und seiner Metabolite, insbesondere den  $\beta$ -Amyloid Peptiden (A $\beta$ -Peptide), beschrieben. Die spezielle SDS-PAGE, im folgenden A $\beta$ -SDS-PAGE genannt, nutzt ein multiphasisches Puffersystem (Bicin/Tris/Tris/ Sulfat), und der Trennmechanismus beruht auf einer harnstoffinduzierten Konformationsänderung von A $\beta$ -Peptiden bei Eintritt in das Trenngelkompartiment. Die Konformationsänderung ist hochgradig spezifisch für die Aminosäureprimärsequenz der jeweiligen A $\beta$ -Peptide und führt zu einer reproduzierbaren Änderung des effektiven Molekularradius. Damit lassen sich zahlreiche A $\beta$ -Peptide auftrennen, die sich N- und C-terminal zum Teil nur um eine Aminosäure unterscheiden und aufgrund des geringen Massenunterschiedes mittels konventioneller SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden können. Die Konformationsänderung wird unter den Bedingungen des multiphasischen Puffersystems durch die Zugabe von Harnstoff oberhalb einer Konzentration von 6M ausgelöst. Die A $\beta$ -peptidspezifische Konformationsänderung wird bei definiertem pH-Wert und Ionenstärke neben der Molarität des eingesetzten Harnstoffs durch die verwendete Porengröße des Polyacrylamidgels, die Konzentration des Detergens (SDS) und die Temperatur während der Trennung bestimmt. Die optimale Trenngelmatrix für die Auftrennung eines breiten Spektrums N- und C-terminal (Nt, Ct) modifizierter A $\beta$ -Peptide wurde mit 12%T/5%C/8MHarnstoff/0.25%SDS gefunden.

[0045] Die A $\beta$ -SDS-PAGE wurde mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) innerhalb einer ersten analytischen Dimension unter Verwendung von Trägerampholyten oder immobilisierter pH-Gradienten (IPG) zur zweidimensionalen Elektrophorese kombiniert (A $\beta$ -2D-PAGE und A $\beta$ -IPG-2D-PAGE). Anhand von A $\beta$ -SDS-PAGE und A $\beta$ -IPG-2D-PAGE wurde das elektrophoretische Laufverhalten der synthetischen A $\beta$ -Peptide A $\beta$ <sub>1-33</sub>, A $\beta$ <sub>1-34</sub>, A $\beta$ <sub>1-35</sub>, A $\beta$ <sub>1-37</sub>, A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-39</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>2-40</sub>, A $\beta$ <sub>3-40</sub>, A $\beta$ <sub>39-40</sub>, A $\beta$ <sub>2-42</sub>, A $\beta$ <sub>3-42</sub> und A $\beta$ <sub>39-42</sub> charakterisiert.

[0046] Der Nachweis erfolgte mittels Western-Immunoblot (PVDF-Membran) und "enhanced chemiluminescence (ECL)" (A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot, A $\beta$ -2D-PAGE/Immunoblot, A $\beta$ -IPG-2D-PAGE/Immunoblot). Dafür wurde der monoklonale Antikörper mAb 1E8 eingesetzt, für den eine ungewöhnlich hohe N-terminale Spezifität nachgewiesen wurde. Unter den Bedingungen des eingesetzten Western-Immunoblot erkennt der mAb 1E8 bei Fehlen des N-terminalen Asparat die entsprechenden A $\beta$ -Peptide 2-x (z.B. A $\beta$ <sub>2-40</sub>, A $\beta$ <sub>2-42</sub>) mit ähnlich guter Nachweisempfindlichkeit wie die A $\beta$ -Peptide 1-x (z.B. A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>). Die synthetischen A $\beta$ -Peptide A $\beta$ <sub>3-40</sub> oder A $\beta$ <sub>3-42</sub>, bei denen zusätzlich N-terminal die Aminosäure Alanin fehlt, und ihre Pyroglutamat-Derivate werden dagegen in physiologisch relevanten Konzentrationen nicht mehr nachgewiesen. Die Nachweisempfindlichkeit im Western-Immunoblot konnte selektiv für den mAb 1E8 verbessert werden, indem anstelle des sonst überwiegend verwendeten Milchpulvers (Immunoblot-1), ein synthetisches Reagenz für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen eingesetzt wurde (Immunoblot-2). Ein kommerziell erhältlicher N-terminal spezifischer monoklonaler Antikörper (6E10), der sonst häufig für den Nachweis von A $\beta$ -Peptiden mittels Western-Immunoblot eingesetzt wird, ist nicht kompatibel mit Immunoblot-2. Durch die Kombination von A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit dem Nachweis der APP-Metabolite über eine hochempfindliche CCD-Kamera konnte ein quantitativer Western-Immunoblot mit einer Nachweisempfindlichkeit von 1 pg für A $\beta$ <sub>1-40</sub> und 2 pg für A $\beta$ <sub>1-42</sub> aufgebaut werden. Für den A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit CCD-Detektion können Intra- und Interassayvariationskoeffizienten von weniger als 10 % für 20 pg A $\beta$ -Peptid realisiert werden. Für den A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit Filmdetektion beträgt die Nachweisempfindlichkeit 0.3 pg für A $\beta$ <sub>1-40</sub> und 0.6 pg für A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Andere Western-Immunoblot Verfahren mit gleich guter Nachweisempfindlichkeit und Variationskoeffizienten für den Nachweis für A $\beta$ -Peptiden sind bislang nicht bekannt: Die oben genannte Nachweisempfindlichkeit ist Voraussetzung für eine neurochemische Denzendiagnostik im Liquor, wenn die A $\beta$ -Peptide direkt nach SDS-/Hitzedenaturierung mittels Western-Immunoblot und CCD-Kamera quantifiziert werden sollen, d.h. ohne vorherige selektive Anreicherung durch Immunpräzipitation. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die Trennschärfe des A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot für die neurochemische De-

menzdiagnostik gerade durch diese Probenvorbereitung noch einmal wesentlich gesteigert werden kann, wenn die SDS-/Hitzenaturierung vor dem Einfrieren der Liquorproben erfolgt.

## 1.2 A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot und neurochemische Demenzdiagnostik

[0047] Der A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 (s.o.) realisiert erstmals die direkte Quantifizierung von sAPP $\alpha$  und A $\beta$ -Peptiden mittels CCD-Kamera in nur 10  $\mu$ l humanen oder tierischen (Meerschweinchen, Kaninchen) Liquorproben. Mit dieser Methode konnte erstmals nachgewiesen werden, dass neben A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> drei weitere carboxyterminal (C-terminal) verkürzte A $\beta$ -Peptide (A $\beta$ <sub>1-37</sub>, A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-39</sub>) hochgradig konserviert in humanem und tierischem Liquor vorkommen. Dabei ist nicht wie bisher angenommen A $\beta$ <sub>1-42</sub> nach A $\beta$ <sub>1-40</sub> das zweithäufigste A $\beta$ -Peptid im humanen Liquor, sondern A $\beta$ <sub>1-38</sub>. Weiter konnte gezeigt werden, dass die drei zusätzlichen C-terminal verkürzten A $\beta$ -Peptide auch im humanen Plasma nachweisbar sind, hier aber mit wesentlich geringerer Konzentration und anderer relativer Verteilung. Insbesondere das Verhältnis A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> scheint ZNS-spezifisch unterschiedlich zu sein.

[0048] Bei einigen Patienten mit AD wird im Liquor zusätzlich das N-terminal verkürzte A $\beta$ -Peptid 2-42 nachweisbar, dass in den Hirnhomogenaten von Patienten mit AD regelhaft intensiv erhöht ist.

[0049] Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zu den absoluten Konzentrationen der A $\beta$ -Peptide im Liquor, die prozentualen Anteile A $\beta$ 1-n% der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-n, mit n = 37, 38, 39, 40 oder 42, an ihrer Gesamtmenge A $\beta$ 1-x mit hoher Sensitivität und Spezifität Patienten mit AD und chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen (CID) identifizieren. Im Gegensatz zu den Absolutkonzentrationen korrelieren die relativen A $\beta$ -Peptidanteile auch signifikant mit dem Schweregrad der Demenz. Weiter konnten für Patienten mit AD spezifische Zusammenhänge zwischen bestimmten prozentualen A $\beta$ -Peptidanteilen gezeigt werden. Dies gilt auch für bestimmte A $\beta$ -Peptidquotienten und die entsprechenden Korrelationen lassen sich für eine verbesserte neurochemische Demenzdiagnostik nutzen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen A $\beta$ <sub>1-38</sub>% und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% bzw. die Korrelation zwischen den A $\beta$ -Peptidquotienten und A $\beta$ <sub>1-38</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> zeigt bei AD eine vergleichsweise hohe Korrelation und ist diagnostisch vielversprechend. Der überraschend deutliche Unterschied zwischen den absoluten und anteiligen Konzentrationen der A $\beta$ -Peptidspecies bezüglich ihrer Eignung für die neurochemische Demenzdiagnostik ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass krankheitsspezifische Änderungen der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität auftreten und diese besser über eine Veränderung der relativen A $\beta$ -Peptidanteile abgebildet werden.

[0050] Zur Probenvorbereitung für den A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot werden A $\beta$ -Peptide und weitere APP-Metabolite SDS-/Hitzenaturiert. Alternativ kann zur selektiven Konzentrierung von A $\beta$ -Peptiden zuvor eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass in Abhängigkeit der Probenvorbereitung unterschiedliche Anteile der in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden A $\beta$ -Peptide gemessen werden können. Dabei ist ein Detergenzien(SDS)-dissozierbarer Anteil von einer A $\beta$ -Peptidfraktion unterscheidbar, die Antikörpern innerhalb von Immunopräzipitation oder ELISA-Verfahren direkt zugänglich ist, d.h. ohne gleichzeitige Behandlung mit Detergenzien. Diese Differenzierung erklärt sich wahrscheinlich durch hochaffine Bindung der A $\beta$ -Peptide an andere Proteine oder A $\beta$ -Autoaggregate. Der SDS-dissoziierbare Anteil ist dabei deutlich höher als die Antikörperdissoziierbare Fraktion. Dieses Phänomen ist spezifisch für A $\beta$ <sub>1-42</sub>, besonders stark ausgeprägt.

[0051] Für A $\beta$ <sub>1-42</sub> ist - im Gegensatz zu A $\beta$ <sub>1-40</sub> - eine kältepräzipitationsbedingte (KP) Erniedrigung durch das Einfrieren der Liquorproben nachweisbar. Die KP-bedingte Erniedrigung wird wahrscheinlich hauptsächlich von der Aggregat-gebundenen Fraktion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> getragen und führt bei einem beträchtlichen Teil der Patienten ohne Alzheimer-Demenz (NDC) zu einer AD-typischen Erniedrigung der Liquorspiegel von A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Dieser Effekt ist besonders deutlich bei Patienten mit mindestens einem ApoE  $\epsilon$ 4 Allel und erklärt wahrscheinlich, warum auch bei Patienten ohne AD, aber mit  $\epsilon$ 4 Allel, im zuvor eingefrorenen Liquor vergleichsweise tiefe Konzentrationen von A $\beta$ <sub>1-42</sub> gemessen werden.

[0052] Durch "protektive" SDS-/Hitzenaturierung vor dem Einfrieren der Probe kann die KP-bedingte Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> bei Patienten ohne AD effektiv verhindert werden. Patienten mit AD zeigen dagegen auch bei Vorbehandlung der Liquorprobe mit SDS-/Hitzenaturierung vor dem Einfrieren niedrige Konzentrationen von A $\beta$ <sub>1-42</sub> im Liquor. Damit wird die diagnostische Trennschärfe des A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot für die neurochemische Demenzdiagnostik durch SDS-/Hitzenaturierung der Liquorproben vor dem Einfriervorgang ganz wesentlich verbessert. Der A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot in Verbindung mit der oben genannten Probenvorbereitung ist auch für die Früh- und präklinische Diagnostik der AD vielversprechend, da zu erwarten ist, dass grenzwertig tiefe A $\beta$ <sub>1-42</sub> Liquorspiegel besonders dann eine beginnende AD anzeigen, wenn sie nicht über eine KP-abhängige Erniedrigung erklärt werden können. Alternativ ist durch prospektive Studien bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen zu überprüfen, ob nicht schon eine ausgeprägte KP-abhängige Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> *per se* prädiktiven Wert für die spätere Entwicklung einer AD hat.

[0053] Die KP-abhängige Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> im Liquor bei AD kann über folgende Hypothesen erklärt werden:

1. der Liquor von Patienten mit AD enthält bei unveränderter A $\beta$ -Peptidgesamt-konzentration selektiv weniger A $\beta$ <sub>1-42</sub>
2. die KP-bedingte Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> kann trotz SDS-/Hitzenaturierung nicht verhindert werden

3.  $A\beta_{1-42}$  ist im Liquor bei AD nicht erniedrigt, sondern durch SDS-stabile Bindung an Trägerproteine oder  $A\beta$ -Peptidaggregate nur vermindert meßbar

Im letzteren Fall (3) wäre diese Fraktion von  $A\beta_{1-42}$  auch dem enzymatischen Katabolismus entzogen, damit pathophysiologisch relevant und potentiell ein molekulares "target" für Wirkstofffindungsprojekte. Dabei muß nicht unbedingt die Zusammensetzung oder die molekulare Primärstruktur  $A\beta_{1-42}$ -bindender Proteine innerhalb des Komplexes verändert sein, sondern bei gleicher Primärstruktur könnte die Affinität der Bindung in Abhängigkeit der Konformation von  $A\beta_{1-42}$  unterschiedlich hoch sein.

[0054] Der Befund, dass bei Patienten mit und ohne AD ein spezifischer Unterschied in der detergentien-dissoziierbaren Fraktion von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor nachweisbar wird, kann auch für andere Verfahren der neurochemischen Demenzdiagnostik genutzt werden (ELISA, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie).

[0055] Besonders vielversprechend ist der Einsatz des ELISA-Triplett  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  mit Berechnung der  $A\beta$ -Peptidquotienten (38/40, 42/38, 42/40) und Bestimmung der KP-abhängigen Erniedrigung der  $A\beta$ -Peptide durch differentielle Probenvorbehandlung.

### 1.3 $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot und neuropathologische Diagnostik

[0056] Der  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot kann für die neuropathologische *post mortem* Diagnostik dementieller Erkrankungen eingesetzt werden. Bei Analyse der Detergentien(RIPA)-löslichen Fraktion von  $A\beta$ -Peptiden in Hirnhomogenaten von Patienten mit AD, anderen dementiellen Erkrankungen und Kontrollen können krankheits- und himnregional-spezifische Expressionsmuster der  $A\beta$ -Peptide 1-37, 1-38, 1-40, 1-42 und 2-42 gezeigt werden. Auffällig ist insbesondere die massive Erhöhung von  $A\beta_{2-42}$  in der RIPA-löslichen Fraktion der Hirnhomogenate bei AD und Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz (LBD). Bei LBD werden diese hohen Konzentrationen von  $A\beta_{2-42}$  beobachtet, wenn die Patienten gleichzeitig eine ausgeprägte  $\beta$ -Amyloidpathologie zeigen (LBD, CERAD C). Auch  $A\beta_{1-42}$  ist bei AD und LBD (CERAD C) regelmäßig und deutlich erhöht. Dabei zeigte die Konzentration der übrigen  $A\beta$ -Peptide eine hohe Interindividuelle Varianz. Dies könnte ein Hinweis auf phänotypische Subtypen der sporadischen AD sein, oder verlaufsabhängig den Scheregrad der Demenz anzeigen.

[0057] Der hier verwendete RIPA-Detergentienmix ist nicht in der Lage, reife neuritische  $\beta$ -Amyloidplaques zu solubilisieren. Die extensiv erhöhten Konzentrationen von  $A\beta_{2-42}$  können daher nicht über  $A\beta_{2-42}$  aus dieser  $\beta$ -Amyloidplaquefraktion erklärt werden. Entsprechend ist auch unwahrscheinlich, dass  $A\beta_{2-42}$  überwiegend durch unspezifische  $\beta$ -Amyloidplaqueassoziierte posttranslationale Veränderungen entsteht. Die hohen intrazerebralen Konzentrationen von  $A\beta_{2-42}$  sind pathophysiologisch relevant, da das Fehlen von Aspartat die Aggregationsneigung von  $A\beta_{1-42}$  erhöht und diese N-terminale Modifikation anscheinend der Bildung reifer  $\beta$ -Amyloidplaques voraus geht.

### 1.4 Quantifizierung von APP-Metaboliten mittels $A\beta$ -SDS-PAGE/ Immunoblot in Zellkultur- und Tiermodellen

[0058] Die carboxyterminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 konnten auch regelhaft im isternalen Liquor von Meerschweinchen und Kaninchen nachgewiesen werden. Weiter gelang der Nachweis in Homogenaten und Überständen (Kurzzellkultur) von hippokampalen Gewebeschnitten des adulten Meerschweinchens.

[0059] Weiter konnte eine neuartige neuronale (telencephale) Primärkultur des Hühnchens etabliert und gezeigt werden, dass auch hier das  $A\beta$ -Peptidquintett mit vergleichbarer relativer Verteilung wie im humanen Liquor in die Überstände freigesetzt wird.

[0060] Das  $A\beta$ -Peptidquintett - und zusätzlich  $A\beta_{2-42}$  - kann auch in den Überständen einer Neuroglioma Tumorzelllinie (H4) nachgewiesen werden, die humanes APP751 mit schwedischer Doppelmutation ( $_{human}APP751_{sw}$ ) überexprimiert. Nach Behandlung der Zellen mit Proteaseinhibitoren, die potentielle Inhibitoren von  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretasen sind, konnte neben der bekannten dosisabhängigen Reduktion von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  auch eine Reduktion der C-terminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37, 1-38, und 1-39 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Entstehung von  $A\beta_{2-42}$  gehemmt. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass die Entstehung der C-terminierten  $A\beta$ -Peptide - besonders deutlich für  $A\beta_{1-37}$  - im Vergleich zu  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  mit anderer Kinetik und schon früher gehemmt wurden. Dieser Effekt wurde besonders deutlich bei Betrachtung der Anteile der einzelnen  $A\beta$ -Peptidspezies an ihrer Gesamtkonzentration. Hier zeigt sich eine interessante Analogie zu den oben diskutierten krankheitsspezifischen Veränderungen der  $A\beta$ -Peptide im Liquor, die auch wesentlich sensibler über die prozentualen Peptidanteile im Liquor erfasst werden konnten. Entsprechend kann vermutet werden, dass eine Heterogenität der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität über Veränderungen in der relativen Zusammensetzung des  $A\beta$ -Peptidquintetts abgebildet werden kann. Dies ist relevant für Wirkstofffindungsprojekte zur Identifizierung isoformspezifischer  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren.

[0061] Bei Behandlung der transgenen H4 Neuroglioma Zellkultur mit Calpaininhibitor-1 konnte bei niedriger Konzentration des Proteaseinhibitors die vorgeschriebene initiale (paradoxe) Konzentrationssteigerung von  $A\beta_{1-42}$  belegt werden. Interessant ist hier, dass der Anstieg von  $A\beta_{1-42}$  nicht mit einer Konzentrationssteigerung von  $A\beta_{2-42}$  korreliert

war. Dieser Befund spricht gegen eine sekundäre Entstehung von  $A\beta_{2-42}$  aus  $A\beta_{1-42}$  und für die Hypothese, dass  $A\beta_{2-42}$  durch einen kombinierten  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretaseschnitt entsteht. In Zusammenhang mit der deutlich und regelmäßig erhöhten Konzentration von  $A\beta_{2-42}$  in Hirnhomogenaten bei AD und dem Nachweis von  $A\beta_{2-42}$  in Liquorproben von Patienten mit AD stellt sich die Frage, ob bei AD eine bestimmte Isoform der  $\beta$ -Sekretase (BACE) überexprimiert wird oder das physiologisch entstehende  $A\beta_{2-42}$  bei AD vermindert katabolisiert wird.

## 2. Hintergrund

[0062] Die molekularen Grundlagen der AD, ihr Bezug zu neueren medikamentösen Ansätzen der Demenzerkrankung und Verfahren der neurochemischen Demenzdiagnostik sind in zwei Übersichtsarbeiten zusammengefaßt (Witfang et al., 1998 und 2000).

[0063] Bisher wurde ein weiteres SDS-PAGE/Immunoblot Verfahren für die Analyse von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}/1-43$  in humanem lumbalen Liquor beschrieben (Ida et al., 1996). Die Differenzierung der  $A\beta$ -Peptide kann hier jedoch nicht durch die elektrophoretische Trennung vorgenommen werden, sondern erfolgt auf der Blot-Membran durch C-terminal selektive monoklonale Antikörper. Gleichzeitig muß  $A\beta_{1-42}$  vor der Trennung durch Einengung der Probe konzentriert werden. Die Einengung erfolgt ohne vorherige SDS-Denaturierung, was bedingt durch die hohe Aggregationsneigung von  $A\beta_{1-42}$  methodisch problematisch erscheint. Für die Bestimmung von  $A\beta_{1-40}$  und 1-42 müssen bei dieser Methodik getrennte Elektrophoresen durchgeführt werden.

[0064] Das für den  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot eingesetzte multiphasische Puffersystem (Witfang et al., 1991), kombiniert die Vorteile spezieller Puffersysteme für Proteine (Laemmli, 1970) und Peptide (Schagger und von Jagow, 1987). Entsprechend können mit diesem SDS-PAGE Verfahren sowohl Proteine als auch Peptide in einem homogenen Polyacrylamidtrenngelsystem mit hoher Auflösung aufgetrennt werden. Weiter wurde unter Verwendung der Harnstoffversion (Witfang et al., 1991) des letztgenannten SDS-PAGE Verfahrens die elektrophoretische Trennung von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  beschrieben (Klaffki et al., 1996). Die Anwendung dieses Verfahrens auf Zellkulturmodelle des familiären AD, die mit Inhibitoren APP-spaltender Enzyme ( $\gamma$ -Sekretase) vorbehandelt wurden, zeigte mittels Nachweis der *in vivo* radioaktiv markierten  $A\beta$ -Peptide 1-40 und 1-42, dass unterschiedliche  $\gamma$ -Sekretasen an der enzymatischen Entstehung von  $A\beta_{1-42}$  beteiligt sind (Klaffki et al., 1996). Mit einer Modifikation dieses Systems konnte auch die Trennung zwischen  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{1-43}$  realisiert werden (Witfang et al., 1997). Die maximale immunologische Nachweisempfindlichkeit des letztgenannten Verfahrens lag bei 50 pg  $A\beta_{1-42}$ , was für die hier gezeigten Applikationen bei weitem nicht ausreicht. Gleichzeitig wurde in dem hier vorgestellten Verfahren die Trenngelmatrix optimiert, um zusätzliche N-terminal und C-terminal modifizierte  $A\beta$ -Peptide aufzutrennen.

[0065] Die SDS-PAGE läßt sich als zweite analytische Dimension mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) in der ersten Dimension als 2D-PAGE kombinieren (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977). Damit gelingt eine zweidimensionale Auftrennung von Polypeptiden und Proteinen nach isoelektrischem Punkt und effektivem Molekularradius. Die isoelektrische Fokussierung, bei Verwendung hochgradig gespreizter immobilisierter pH-Gradienten (Gorg et al., 1995; Gorg et al., 1997; Righetti und Bossi, 1997), kann minimale Ladungsunterschiede aufdecken. Der zweidimensionale  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot kann daher auch für die hochauflösende Analyse von posttranslationalen Modifikationen der APP-Metabolite eingesetzt werden. Gleichzeitig kann eine Nachweisempfindlichkeit im oberen Femtogrammbeereich realisiert werden. Posttranslationale Modifikationen können in spezifischer Weise das Aggregationsverhalten von  $A\beta$ -Peptiden beeinflussen und sind damit pathophysiologisch und diagnostisch relevant (Thome et al., 1996; Thome J., 1996; Kuo et al., 1997; Russo et al., 1997; Tamaoka et al., 1997). Für die neurochemische Demenzdiagnostik ist relevant, dass selektiv der Anteil von N-terminal modifiziertem  $A\beta_{X-42/43}$  zu  $A\beta_{1-42/43}$ , nicht jedoch der Anteil N-terminal modifiziertes  $A\beta_{X-40}$  zu  $A\beta_{1-40}$  ansteigt (Tamaoka et al., 1997). Zusätzlich zur Bestimmung der  $A\beta$ -Peptide erlaubt der  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot auch die Quantifizierung von sAPP $\alpha$ , dass bei AD im Liquor erniedrigt gemessen wird (Sennvik et al., 2000). Für die Bestimmung von sAPP $\alpha$  wird das hamstoffhaltige Trenngelkompartiment mit einem oberen (kathodischen) Trenngel ohne Harnstoff und größerer Porengröße kombiniert.

[0066] Der quantitative  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot erlaubt die gleichzeitige und ultrasensitive Bestimmung eines Spektrums von APP-Metaboliten, die hohe Relevanz für die neurochemische Frühdiagnostik und Pathogenese der AD besitzen. Das Verfahren kann auch innerhalb der tiereperimentellen und klinischen Evaluation neuer Pharmaka eingesetzt werden, die in den Metabolismus oder Katabolismus von  $A\beta$ -Peptiden eingreifen.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 A $\beta$ -SDS-PAGE

##### 3.1.1 Material und Reagentien

[0067]

Bio-RAD (Richmond, CA, USA): Mini Protean II Elektrophorese System, Acrylamid (Best.-Nr. 161-0101), N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Best.-Nr. 161-0201); Merck (Darmstadt, Deutschland): Ammoniumperoxodisulfat (AMPS, Best.-Nr. 1201.1000), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Best.-Nr. 1.09072.1000), Natriumhydroxid Plättchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498), Aktivkohle p.A. (Best.-Nr. 1.02186.0250), Saccharose (Best.-Nr. 1.07654.1000)  
 Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Tris ultra rein (Best.-Nr. 100840)  
 Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430), Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl) methan (Bis-Tris, Best.-Nr. 50003), N,N'-Bis-(2-hydroxyethyl)glycine p.A. (Bicine, Best.-Nr. 01848); GibcoBRL Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Harnstoff (Best.-Nr. 15716-012); Serva (Heidelberg, Deutschland): N,N,N',N'-Tetramethylethylen-di-Amin (TEMED, Best.-Nr. 35925); Sigma (Steinheim, Deutschland): 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154);  
 Bachem (Bubendorf, Schweiz): A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>  
 Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (Berlin, Deutschland): A $\beta$ <sub>1-33</sub>, A $\beta$ <sub>1-34</sub>, A $\beta$ <sub>1-35</sub>, A $\beta$ <sub>1-37</sub>, A $\beta$ <sub>1-39</sub>, A $\beta$ <sub>2-40</sub>, A $\beta$ <sub>2-42</sub>, A $\beta$ <sub>3-40</sub>, A $\beta$ <sub>3-42</sub>, A $\beta$ <sub>30-40</sub>, A $\beta$ <sub>3-42</sub>  
 Amersham Pharmacia Biotech AB (Buckinghamshire, England) und Serva (Heidelberg, Deutschland): Trypsin Inhibitor Rinderlunge (M, 6500), Mellitin (M, 2847) und Met-Lys-Bradykinin (M, 1320) wurden über Serva bezogen und dem "low-molecular-weight (LMW) marker kit" von Amersham Pharmacia zugefügt. Das LMW Kit setzt sich zusammen aus: Phosphorylase b (M, 94000), Rinderserum Albumin (M, 67000), Ovalbumin (M, 43000), Carbonic Anhydrase (M, 30000), Trypsin Inhibitor, Sojabohne (M, 20100) und  $\alpha$ -Lactalbumin (M, 14400).

##### 3.1.2 Gelzusammensetzung und Elektrophorese

[0068] Die SDS-PAGE wurde durchgeführt mittels des Bio-Rad Mini Protean II Elektrophorese System. Die Größe der verwendeten Gelkompartimente war wie folgt: Trenngellänge etwa 54 mm; Sammelgellänge etwa 5 mm (entsprechend einem Volumen von 250  $\mu$ l); Kammgellänge etwa 12-15 mm; Geldicke jeweils 0,50 mm, Gelbreite jeweils 85 mm. Trenn- und Sammelgele für die zweite analytische Dimension innerhalb der A $\beta$ -2D-PAGE haben eine Geldicke von 1,0 mm.

[0069] Für den Probenauftrag wird ein 15-zähliger Probenauftragskamm verwendet (Zahnbreite ca. 3 mm, Zahnabstand 2 mm). Die resultierende Probenauftragskammer im Kammgel misst etwa 3x10 mm. Die max. Probenauftragsmenge sollte 10  $\mu$ l nicht überschreiten, um Verschleppungen zwischen den Probenschächten sicher zu verhindern. Die Proben werden nach Einfüllen des Kathodenpuffers unterschichtet. Elektrophorese: a) 12 mA / 0,5 mm Geldicke bei konstanter Stromstärke über 2h, b) 1,0 mm Gele der zweiten analytischen Dimension: 60 Volt / 1,0 mm Geldicke für 10 min, 120 Volt / 1,0 mm Geldicke über 1h 45min.

[0070] Für die Trenngelkompartimente wurde die Harnstoffversion des Bicin/Tris SDS-PAGE Verfahrens von Wiltfang et al. (Wiltfang et al., 1991) verwendet und für die vorgestellten Applikationen in wesentlichen Aspekten modifiziert. Tabelle 1 faßt die konzentrierten Puffer für die Gelkompartimente, Kathodenpuffer, Anodenpuffer und die Acrylamidstammlösung zusammen. Die Gelzusammensetzung für die A $\beta$ -SDS-PAGE zur optimierten Trennung von APP-Metaboliten und A $\beta$ -Peptiden in humanen oder tierischen biologischen Proben findet sich in Tabelle 2.

##### 3.1.3 Probenvorbereitung für A $\beta$ -SDS-PAGE

###### 3.1.3.1 Aufnahme von Liquorproben

[0071] 300  $\mu$ l Aliquots des SDS-SB-3 ohne 2-Mercaptoethanol (Tabelle 3) werden mittels Speed-Vac in 1,5 ml Eppendorf Probengefäßen ("safe lock") auf Trockensubstanz eingeengt und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert. Liquorproben werden aliquotiert und mittels des in den Eppendorfgefäßen als Trockensubstanz vorgelegten SDS-SB-3 unterschiedlich aufgearbeitet:

(a) Nativ eingefrorener Liquor

330  $\mu$ l zentrifugierter Liquor wird nativ bei -80°C in 1,5 ml Eppendorfgefäßen eingefroren und gelagert. Nach

Auftauen und Vortexschritt wird mit 300 µl Liquor und 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol der vorgelegte SDS-SB-3 aufgenommen und nach Vortexschritt für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgt die Aß-SDS-PAGE.

(b) Vorbehandlung mittels SDS-/Hitzenaturierung

Der als Trockensubstanz vorgelegte SDS-SB-3 wird mit 300 µl zentrifugiertem Liquor aufgenommen und nach Vortexschritt für 5 min. bei 95°C erhitzt (keine Zugabe von 2-Mercaptoethanol!). Anschließend wird der SDS-/Hitzenaturierte Liquor bei -80°C gelagert. Vor Aß-SDS-PAGE wird die Probe nach Zugabe von 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol erneut für 5 min. bei 95°C erhitzt.

(c) Einengung von Liquorproben für die Bestimmung von Aß-Peptiden

Nach SDS-/Hitzenaturierung, aber vor Zugabe von 2-Mercaptoethanol, kann die Liquorprobe, oder auch andere biologische Proben, mittels SpeedVac auf Trockensubstanz eingengt werden und mit 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol aufgenommen werden (3-fache Konzentrierung). Vor Aß-SDS-PAGE erfolgt erneut Erhitzen auf 95°C für 5 min.

[0072] Durch die SDS-/Hitzenaturierung vor Einengung der Probe sollen Proteolyse, Präzipitation und Autaggregation der Aß-Peptide während der Konzentrierung vermieden werden.

[0073] Die reduzierte SDS-Konzentration in SDS-SB-3 ist erforderlich, weil höhere SDS-Konzentrationen nach dreifacher Einengung der Proben und bei einem Auftragsvolumen von ca. 10 µl zu einem beeinträchtigten Laufverhalten der Aß-Peptide am anodischen Ende des hamstoffhaltigen Trenngels führen. Gleichzeitig ist die SDS-Konzentration von 0.5% w/v in SDS-SB-3 aber noch ausreichend hoch für eine vollständige SDS-/Hitzenaturierung der Probe.

### 3.1.3.2 Aufnahme anderer biologischer Proben

[0074] Liegen die Proben flüssig vor (z.B. Zellkulturüberstände, Zellhomogenate) und ist die Aß-Peptidkonzentration ausreichend hoch kann eine Volumeneinheit Probe mit einer Volumeneinheit des zweifach konzentrierten SDS-SB-2 aufgenommen werden (Tabelle 3).

### 3.1.3.3 Aufnahme der Proben nach Immunopräzipitation (IP)

[0075] Die mittels magnetischen Dynabeads (s.u.) immobilisierten APP-Metabolite werden nach dem abschließenden Waschschrift bei 37°C für 10 min im Ultraschallbad unter Verwendung des SDS-SB-1 oder SDS-PB-3 (jeweils ohne 2-Mercaptoethanol!) aus der Antigenbindung eluiert. Nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol auf 2.5% w/v, erfolgt Erhitzen auf 95°C für 5 min. Bei Verwendung von SDS-PB-3 können die Proben anschließend durch Einengung auf Trockensubstanz und Aufnahme mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> mittels SpeedVac nochmals dreifach konzentriert werden.

## 3.2 Konventionelle Aß-2D-PAGE (Trägerampholyt IEF)

[0076] Die Trägerampholyt-IEF in Rundgelen der ersten analytischen Dimension und die vertikale Aß-SDS-PAGE der zweiten analytischen Dimension werden mit dem Mini-Protein II 2-D Cell System von Bio-Rad durchgeführt.

### 3.2.1 Materialien und Reagenzien für die Trägerampholyt IEF

#### [0077]

Bio-RAD (Richmond, CA, USA): Mini-Protein II 2-D Cell System, Glasröhrchen (Ø 1mm), Agarose (162-0017); Merck (Darmstadt, Deutschland): CHAPS (Best.-Nr. 1.11662.0010), Natriumhydroxid Plättchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), Phosphorsäure 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Best.-Nr. 1.00573.1000); Serva (Heidelberg, Deutschland): Servalyt® pH 5-6 (Best.-Nr. 42924) pH 4-7 (Best.-Nr. 42948) pH 3-10 (Best.-Nr. 42951); Fluka (Buchs, Schweiz): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-Nr. 56741); GibcoBRL/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Hamstoff (Best.-Nr. 15716-012); Sigma (Steinheim, Deutschland): 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154); Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430), Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl) methan (Bis-Tris, Best.-Nr. 50003), N,N'-Bis-(2-hydroxyethyl) glycyl p.A. (Bicine, Best.-Nr. 01848)

### 3.2.2 Probenaufnahme für die Trägerampholyt IEF

[0078] Die Probenaufnahme erfolgt in IEF-SB (Tabelle 4a). Trockensubstanz und mittels MSP magnetisch immobilisierte Dynabeads (s.u.) werden direkt mit dem IEF-SB unmittelbar vor IEF aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert. Für die Aufnahme von Liquorproben wird eine Volumeneinheit Liquor mit einer Volumeneinheit IEF-SB aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert.

### 3.2.3 Erste analytische Dimension: Trägerampholyt IEF in Rundgelen

[0079] Glasröhrchen (Ø 1mm) werden zur Gelpolymerisation mit der Monomerlösung aus Tabelle 4b gefüllt. Die IEF Rundgele werden auf eine Länge von 60 mm polymerisiert. 20 µl Probe nach direkter Aufnahme in IEF-SB (10 µl Liquor plus 10 µl IEF-SB) oder 10 µl Eluat aus der Immunopräzipitation in IEF-SB (Tabelle 4a) werden aufgetragen und mit dem kathodischen Elektrolyten überschichtet. Diese Seite der Glasröhrchen wird mit der oberen kathodischen Elektrolytkammer verbunden. Die Zusammensetzung von Anolyt und Katholyt für die Trägerampholyt IEF findet sich in Tabelle 4c.

[0080] Anschließend wird wie folgt bei Raumtemperatur fokussiert: 100V x 1h, 200Vx11h, 500Vx2h, 1000Vx1h (Σ 4300 Vxh).

[0081] Nach IEF werden die Rundgele mittels Wasserdruck aus den Glasröhrchen ausgestoßen und für 5 min. im IEF-Equilibrationsspufer (Tabelle 4d) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die IEF Gele auf das Sammelgel (s.u.) der Aß-SDS-PAGE aufgelegt und mit der IEF-Agaroselösung (Tabelle 4d) in ihrer Position fixiert. Eine Probenatmosphäre für den vergleichenden Auftrag von synthetischen Aß-Peptiden oder M<sub>r</sub> Markerproteinen wird mittels eines Teflonzahns in der heißen Agarose geformt.

### 3.2.4 Zweite analytische Dimension: Aß-SDS-PAGE

[0082] Die Aß-SDS-PAGE erfolgte, wie in Tabelle 1 und 2 ausgeführt (Trenngel: 12%T/5%C/8M Harnstoff). Ein Kammgel wird nicht polymerisiert. Die Geldicke der verwendeten Trenngele beträgt 1mm. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur: 10 min. / 60 V, 90 min. / 120 V.

### 3.3 Aß-IPG-2D-PAGE

#### 3.3.1 Material und Reagentien

[0083]

GibcoBRL/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Harnstoff (Best.-Nr. 15716-012)

Merck (Darmstadt, Deutschland): CHAPS (Best.-Nr. 1.11662.0010), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), Glycerin (100%) (Best.-Nr. 1.04092.1000)

Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430); Serva (Heidelberg, Deutschland): Serdolit MB-1 (Best.-Nr. 40701), Dithiotreitol (DTT, Best.-Nr. 20710)

Amersham Pharmacia Biotech AB (AB (Buckinghamshire, England): Pharmalyte pH 3-10 (Best.-Nr. 17-0456-01), Pharmalyte pH 4-6,5 (Best.-Nr. 17-0452-01), Immobiline DryStrip 70 x 3 x 0,5 mm, pH 4-7 L (Best.-Nr. 17-8001-10);

Sigma (Steinheim, Deutschland): Iodoacetamide (Best.-Nr. I-6125)

BioRAD (Richmond, CA, USA): Agarose (162-0017)

### 3.3.2 Probenaufnahme

[0084] Die Probenaufnahme erfolgt in IPG-SB (Tabelle 5a). Trockensubstanz und mittels MSP magnetisch immobilisierte Dynabeads (s.u.) werden direkt mit dem IPG-SB unmittelbar vor IEF aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert. Aufnahme flüssiger biologischer Proben: Nach Entfernung des Mischbettionenaustauschers (Serdolit MB-1) wird der IPB-SB in Eppendorf Probengefäßen aliquotiert (z.B. 100 µl) und mittels SpeedVac bei Raumtemperatur auf Trockensubstanz eingeeignet. Der als Trockensubstanz vorgelegte IPG-SB wird im Volumenverhältnis 1:1 mit Probe aufgenommen (z.B. 100 µl) und nach Vortexschritt (1 min.) für 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert.

### 3.3.3 IPG-IEF

[0085] Die IEF mittels kommerzieller IPG "DryStrips" erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers

(Amersham Pharmacia Biotech / Kurzanleitung 71-5009-57, Ausgabe AA, 99-04). IPG "DryStrips" (4-7, linearer pH-Gradient, Länge 7cm) wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter Verwendung der Rehydrierungslösung aus Tabelle 5a auf eine Geldicke von 0.5 mm rehydriert. Die Probenauftragsvorrichtung ("sample cups") wird auf die basische Seite der IPG Streifen, etwa bei pH 8.5, aufgelegt (kathodischer Auftrag) und 30 µl Probe aufgetragen. Die IPG-IEF erfolgt für 30 min / 300V, 30 min / 800V, 30 min. / 1400V und 5 h / 2000V (Σ 12500 Vxh).

### 3.3.4 Zweite analytische Dimension: Aß-SDS-PAGE

[0086] Nach IPG-IEF werden die "DryStrips" für 2x10 min. equilibriert (Tabelle 5b). Die erste Equilibrierungslösung enthält DTT (50 mg/5ml), die zweite Lösung Jodacetamid (240 mg / 5 ml) zur Neutralisierung von überschüssigem DTT, das sonst bei Silberfärbung der Gele zu Färbefartefakten führt. Bei Western-Immunoblot entfällt der zweite Equilibrierungsschritt. Die equilibrierten IPG "DryStrips" werden auf dem Sammelgel der Aß-SDS-PAGE mittels Agaroselösung (Tabelle 5c) fixiert. Eine Probentasche für den vergleichenden Auftrag von synthetischen Aß-Peptiden oder M<sub>1</sub> Markerproteinen wird mittels eines Teflonzahns in der heißen Agarose angelegt. Die Elektrophorese erfolgt entsprechend 3.1.2

### 3.4 Immunopräzipitation

#### 3.4.1 Material und Reagentien, Antikörper

[0087]

Biochrom KG (Berlin, Deutschland): HEPES (Best.-Nr. L1803), PBS Dulbecco, ohne Ca<sup>++</sup>, ohne Mg<sup>++</sup> (Best.-Nr. L182-50); Merck (Darmstadt, Deutschland): Natriumhydroxid Plättchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498); Natriumchlorid (NaCl, Best.-Nr. 1.01540.0500); Fluka (Buchs, Schweiz): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-Nr. 56741), Natrium Desoxycholate (Na-DCC, Best.-Nr. 30968); Biomer (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430); Boehringer (Mannheim, Deutschland): Proteinase inhibitor cocktail tablets, complete™ Mini (Best.-Nr. 1836153); Deutsche Dynal GmbH (Hamburg, Deutschland): Dynabeads® M280 Schaf anti-Mouse IgG (Best.-Nr. 112.02); Biometra (Göttingen, Deutschland): Magnetic Separation Stand (MPS); Sigma (Steinheim, Deutschland): Bovines Albumin (BSA, Best.-Nr. A-4378), 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154), Natrium Azid (Na-Azid, Best.-Nr. A-2002); Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Tris ultra rein (Best.-Nr. 100640); Schering AG (Berlin, Deutschland): mAb1E8 (Maus IgG1); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (St. Louis, Mo, USA): mAb 6E10, gereinigter Maus IgG1 (Best.-Nr. 320-02).

#### 3.4.2 Vorbereitung der Dynabeads M-280 (Schaf Anti-Maus IgG)

[0088] 250µl Suspension (6.7 x 10<sup>8</sup> beads/ml) ohne Schaumbildung gut schütteln und 3 x 5 min. mit 1 ml PBS/BSA (0.15 M NaCl in 0.01 M Na-Phosphat, 0.1 % w/v BSA) waschen. Beads im Magnetic Separation Stand (MSP) der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) immobilisieren und Überstand abnehmen.

#### 3.4.3 Vorbehandlung der biologischen Proben

[0089] 0.75 Volumeneinheiten Probe werden mit 0.25 Volumeneinheiten Protein-Inhibitor-Cocktail Stammlösung (PI-Stammlsg.) aufgenommen. PI-Stammlsg.: Löse 1 Tabl. Complete™ Mini in 1.5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

#### 3.4.4 mAb-Aktivierung der magnetischen Mikropartikel ("beads") mittels der direkten IP-Methode

[0090] Etwa 1.675 x 10<sup>8</sup> "beads" (250 µl vorbereitete Bead-Suspension, s.o.) werden im MSP in 1.5 ml Eppendorf Cups wandständig magnetisch immobilisiert und mit 7.5 µg mAb 6E10 (Senetek Drug Delivery Technologies, Inc., St. Louis, Mo, USA) oder 10 µg mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland) in 250 µl PBS/BSA bei 4 °C für 20 h inkubiert. Anschließend für 4 x 30 min. mit 1 ml PBS/BSA gewaschen und am Ende in 250 µl PBS/BSA/0.01% Na-Azid aufgenommen und bei 4 °C bis zum Einsatz für die Immunopräzipitation gelagert. Die so aktivierten Beads können ohne nennenswerten Kapazitätsverlust bis zu drei Monate gelagert werden: Direkt vor Einsatz in die Immunopräzipitationsbiologischer Proben werden die aktivierten Beads 3x3 min. mit 250 µl PBS/BSA ohne Zusatz von Na-Azid gewaschen.

### 3.4.5 Immunopräzipitation aus humanem Liquor

#### a) ohne Detergentien

[0091] 25 µl aktivierter DynaBeads (ca.  $1.675 \times 10^7$  beads) werden mit 268 µl Liquor/PI-Stammisg. (200 µl Liquor + 68 µl PI-Stammisg.) vermischt und mit 732 µl 50 mM HEPES-Puffer, pH 7.4, in Eppendorf-Cups auf 1 ml gebracht. Die Inkubation erfolgt für 20 h bei 4 °C auf einem Schüttelmixer (ständige Agitation der Probe). Anschließend werden die Beads im MSP-Stand immobilisiert und der Überstand entfernt. Danach werden die Beads 4 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 1 ml PBS/0.1%BSA gewaschen. Abschließend werden die Beads 1 x 3 min. bei Raumtemperatur in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) gewaschen. Für die Aß-SDS-PAGE erfolgt die Probenaufnahme der magnetisch immobilisierten Beads mit 25 µl SDS-PB-1 für 5 min. bei 95 °C. Für die Aß-2D-PAGE wird mit 25 µl IEF-SB oder IPG-SB aufgenommen und für 10 min. bei 37 °C im Ultraschallbad inkubiert. Für die Aß-SDS-PAGE werden 4 µl Probe aufgetragen, entsprechend der Aß-Peptidmenge, die in 32 µl Liquorvolumen vorhanden ist. Für die Aß-2D-PAGE werden 10 µl aufgetragen, entsprechend der Aß-Peptidmenge die in 80 µl Liquorvolumen vorhanden ist.

#### b) mit Detergentien (RIPA<sub>0.5x</sub>-IP)

[0092] 200 µl Liquor werden mit 200 µl 5fach-konzentriertem RIPA<sub>0.5x</sub> Puffer (Tabelle 6) vermischt und mit 600 µl H<sub>2</sub>O<sub>95</sub> in Eppendorf Cups auf 1ml gebracht. Die Durchführung der Immunpräzipitation entspricht der unter A beschriebenen Methode. Der RIPA<sub>0.5x</sub>-Puffer enthält Proteaseinhibitoren (Tabelle 6).

### 3.4.6 Immunopräzipitation aus humanem Gehirngewebe (RIPA<sub>1x</sub>-IP)

[0093] Gehirngewebe (ca. 50 mg) wird mit 1ml RIPA<sub>1x</sub> Puffer (Tabelle 6) in 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mittels Ultraschallfinger homogenisiert und anschließend für 5 min. (4°C) bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Proteingehalt des Homogenatüberstands wird auf 3 mg/ml mit RIPA<sub>1x</sub> Puffer eingestellt und 1 ml Hirnhomogenat zusammen mit 50 µl aktivierten DynaBeads (ca.  $3.35 \times 10^7$  beads) wie unter (a) beschrieben immunpräzipitiert. Der RIPA<sub>1.0x</sub>-Puffer enthält Proteaseinhibitoren (Tabelle 6).

### 3.4.7 Immunopräzipitation aus Zellkulturüberständen (RIPA<sub>0.5x</sub>-IP)

[0094] 400 µl Zellkulturüberstand werden mit 100 µl 5fach-konzentriertem RIPA<sub>0.5x</sub> Puffer (alternativ: 800 µl Zellkulturüberstand mit 200 µl 5fach-konzentriertem RIPA<sub>0.5x</sub> Puffer) und 25 µl aktivierten DynaBeads vermischt und wie unter (a) beschrieben immunpräzipitiert. Für die Aß-SDS-PAGE werden 6 µl Probe aufgetragen, entsprechend der Aß-Peptidmenge, die in 96 µl Zellkulturüberstandsvolumen vorhanden ist.

## 3.5 Fixierung und Silberfärbung

### 3.5.1 Reagentien

[0095]

Merck (Darmstadt, Deutschland): Natriumthiosulfat-Pentahydrat pA ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , Best.-Nr. 1.06516.0500), Natriumcarbonat pA ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Best.-Nr. 1.06392.1000), Glycin Puffersubstanz (Best.-Nr. 1.04169.0250), Formaldehyd min. 37% pA (Best.-Nr. 1.04003.1000), Glutaraldehyd 25%ig (Best.-Nr. 8.20603.0100), Natriumazetat wasserfrei (Best.-Nr. 1.06268.1000);

Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Silbernitrat p.A. (Best.-Nr. 27-100-601);  
Zentralapotheke der Universität Göttingen: Ethanol 99.9%, vergaelt

### 3.5.2 Durchführung

[0096] Nach Aß-SDS-PAGE oder Aß-2D-PAGE werden die Peptide und Proteine für 45 min bei Raumtemp. mit Glutaraldehyd in Borat/Phosphatpuffer nach Wiltfang et al. (Wiltfang et al., 1997) fixiert. Die Silberfärbung wurde leicht modifiziert nach Heukeshoven et al. (Heukeshoven and Dernick, 1988) durchgeführt (Tabelle 7)

### 3.6 Western-Immunoblot

#### 3.6.1 Material und Reagentien, Antikörper

[0097]

Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland); Tris ultra rein (Best.-Nr. 100840); Sigma (Steinheim, Deutschland); Borsäure (Borsäure, Best.-Nr. B-7901), Natrium Azid (Na-Azid, Best.-Nr. A-2002); J.T.Baker (Deventer, Holland); Methanol (Best.-Nr. 9263); BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA); Filter Paper extra dick (Best.-Nr. 1703960), Non-Fat Dry Milk (Best.-Nr. 170-6404); Millipore Corporation (Bedford, MA, USA); Immobilon-P Transfer Membran (Best.-Nr. IPVH00010); Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA, USA); SemiPhor semi-dry transfer unit (Best.-Nr. 80-6211-86); Biochrom KG (Berlin, Deutschland); PBS Dulbecco, ohne  $\text{Ca}^{++}$ , ohne  $\text{Mg}^{++}$  (Best.-Nr. L182-50); Schering AG (Berlin, Deutschland); mAb 1E8 (Maus IgG1); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (St. Louis, Mo, USA); gereinigter mAb 6E10, Maus IgG1 (Best.-Nr. 320-02); Roth (Karlsruhe, Deutschland); Roti-Block (Best.-Nr. A151.1).

#### 3.6.2 Durchführung des Western-Immunoblot

[0098] Im Anschluß an die  $\text{A}\beta$ -SDS-PAGE oder  $\text{A}\beta$ -2D-PAGE erfolgt der Transfer mittels Semidry-Westernblot und einem multiphasischen Puffersystem auf PVDF Nachweismembranen. Die Blotpuffer sind in Tabelle 8 zusammenge stellt.

Der Aufbau des Blotsandwich von der Anode zur Kathode ist wie folgt: Eine Filterpapierlage mit Puffer A, eine Filterpapierlage und die PVDF-Membran mit Puffer B, Gel und abschließend zwei Filterpapierlagen mit Puffer C. Gele werden unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese für ca. 10 sec. in Puffer C einkubiert. Als Filterpapier wird extrastarkes Filterpapier der Firma BioRad verwendet. Nach Untersuchung von PVDF-Membranen unterschiedlicher Hersteller ergab die Immobilon-P Membran der Firma Millipore, die geringste Hintergrundfärbung und effektivste Immobilisation der  $\text{A}\beta$ -Peptide, insbesondere von  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Innerhalb des Immunoblotprotokolls. Die Immobilon-P Membranen werden entsprechend den Herstellerangaben vor Gebrauch mit Methanol benetzt, anschließend für 1 min. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  inkubiert und dann in Puffer B überführt. Der Transfer erfolgt für  $\text{A}\beta$ -SDS-PAGE ( $\varnothing$  0.5 mm) für 30 min. oder  $\text{A}\beta$ -2D-PAGE Gele ( $\varnothing$  1.0 mm) für 45 min. bei Raumtemperatur mit 1  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .

[0099] Nach Ende des Western-Blot wird die Immobilon-P Membran für ca. 30 sec. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gewaschen und 3 min. in der Mikrowelle in PBS (ohne Tween-20 l) gekocht. Der Kochschritt ist essentiell, um die maximale Nachweisempfindlichkeit zu realisieren.

##### 3.6.2.1 Immunoblot-1 (Milchpulver-Blockschritt)

[0100] Die für den Immunoblot-1 verwendeten Puffer, Lösungen und Antikörper sind in Tabelle 9a & b zusammengefaßt.

- **Blockschritt:** 1 h bei Raumtemperatur in 4 ml PBS-T-M /  $\text{cm}^2$  Membran
- **Inkubation mit primärem mAb:** 15 h bei 4° C und abschließend 30 min. bei Raumtemp. in einer 1:4000 Verdünnung des mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland) oder in einer 1:1000 Verdünnung des mAb 6E10 (aufgereinigt: 1 mg/ml; Senetek Drug Delivery Technologies, Inc., St. Louis, Mo, USA) in 0.074 ml PBS-T-M /  $\text{cm}^2$  (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequenter Agitation mit Rotationsmischer)
- **Waschschritt 1:** 3x10 min. mit PBS-T (4  $\text{mV}/\text{cm}^2$ ) bei Raumtemp.
- **Inkubation mit sekundärem mAb:** 1 h bei Raumtemp. mit einer 1:3000 Verdünnung des sekundären mAb (biotinylierter anti-Maus IgG, Pferd, H+L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in 0.074 ml PBS-T-M /  $\text{cm}^2$  Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer)
- **Waschschritt 2:** wie Waschschritt 1
- **Streptavidin-Avidin Verstärkung:** 1 h bei Raumtemperatur mit 1:3000 Verdünnung von "Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex RPN 1051" (Amersham, Buckinghamshire, England) in PBS-T mit 0.26  $\text{mV}/\text{cm}^2$  Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer)
- **Waschschritt 3:** wie Waschschritt 1
- **ECL-Entwicklung:** 5 min. bei Raumtemp. mit 0.1  $\text{mV}/\text{cm}^2$  ECLPlus™ Lösung (RPN 2132; Amersham, Buckinghamshire, England) gemäß Angaben des Herstellers. Anschließend Entfernung von überschüssigem Reagenz (5. sec. zwischen 2 Folien Filterpapier) und Einschlagen der feuchten Membran in Frischhaltefolie.

## 3.6.2.2 Immunoblot-2 (Roti-Block)

[0101] Die für den Immunoblot-2 verwendeten Puffer, Lösungen und Antikörper sind in Tabelle 9a & b zusammengefaßt.

- **Blockschritt:** 1 h bei Raumtemperatur in 25ml 1:10 Roti-Block/ $H_2O_{dd}$
- **Inkubation mit primärem mAb:** 15 h bei 4° C und abschließend 30 min. bei Raumtemp. in einer 1:4000 Verdünnung des mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland). Der mAb 6E10 ist bedingt durch ein hohes Hintergrundsignal nicht kompatibel mit Roti-Block.
- **Waschschritt 1:** 3x10 min. mit PBS-T (4 ml/cm<sup>2</sup>) bei Raumtemp.
- **Inkubation mit sekundärem Ab:** 1 h bei Raumtemp. mit einer 1:3000 Verdünnung des sekundären mAb (biotinylierter anti-Maus IgG, Pferd, H+L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in 0.074 ml PBS-T/cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmixer)
- **Waschschritt 2:** wie Waschschritt 1
- **Streptavidin-Avidin Verstärkung:** 1 h bei Raumtemperatur mit 1:3000 Verdünnung von "Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex RPN 1051" (Amersham, Buckinghamshire, England) in PBS-T mit 0.26ml/cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmixer)
- **Waschschritt 3:** wie Waschschritt 1
- **ECL-Entwicklung:** 5 min. bei Raumtemp. mit 0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECLPlus™ Lösung (RPN 2132; Amersham, Buckinghamshire, England) gemäß Angaben des Herstellers. Anschließend Entfernung von überschüssigem Reagenz (5 sec. zwischen 2 Folien Filterpapier) und Einschlagen der feuchten Membran in Frischhaltefolie.

## 3.6.3 Quantifizierung des ECL-Signals mittels densitometrischer Filmauswertung

## 3.6.3.1 Material und Reagentien

[0102]

Amersham Pharmacia Biotech AB (Buckinghamshire, England): ECL<sup>Plus</sup> Western Blotting Detection System (Best.-Nr. RPN 2132), Hyperfilm™ ECL™ (Best.-Nr. RPN 2103H);  
Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland): Gel-Blotting Papier (Best.-Nr. 426690); Tropix (Bedford, MA, USA): Development Folders, 14 cm x 19 cm (Best.-Nr. XF030); Biometra (Göttingen, Deutschland): BioDoc software  
Epson Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland): Laserscanner Epson GT 9000

## 3.6.3.2 ECL-Entwicklung

[0103] Nach dem letzten Waschschritt in PBS-T wird die PVDF-Membran auf eine Teflonunterlage gelegt und überschüssiger Waschpuffer durch Auflegen einer Lage KIMWIPE® Lite 200 Laborwischtücher entfernt. Es folgt eine Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur mit 0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECLPlus™ Lösung. Um überschüssige ECLPlus™ Lösung zu entfernen, wird die Membran zwischen zwei Lagen Gel-Blotting Papier gelegt und zur Signaldetektion in einen "Development Folder" überführt, der eine optimale Detektion gewährleistet und das Austrocknen der Membran verhindert.

## 3.6.3.3 Quantifizierung

[0104] Aufgetragen wurden jeweils 8 µl Liquorprobe. Jedes Gel führte eine Verdünnungsreihe eines Gemisches synthetischer Aβ-Peptide 1-40 und 1-42 (Aβ<sub>1-42</sub>: 5,10,15,25 pg; Aβ<sub>1-40</sub>: 20, 50, 75, 100 pg). Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der Aβ-Peptid Konzentrationen erfolgte für jedes Gel anhand seiner Eichreihe. Anschließend wurde der Mittelwert (n=3) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Der Intraassay-Variationskoeffizient wurde anhand der drei Einfachbestimmungen berechnet, die auf jeweils getrennten Gelen im gleichen Experiment unter Verwendung identischer Stammlösungen bestimmt wurden. Der Interassay-Variationskoeffizient wurde anhand der Aβ<sub>1-42</sub> Mittelwerte bestimmt, die in unabhängigen Experimenten (d.h. Untersuchungstagen) ermittelt wurden.

[0105] Mittels Dreifachbestimmung ermittelte Ausreißer wurden bei Berechnung beider Variationskoeffizienten nicht eliminiert, d.h. alle technisch auswertbaren Aβ-Peptidbanden gingen in die Berechnung ein.

[0106] Zusätzlich wurden für Aβ<sub>1-40</sub>, Aβ<sub>1-42</sub> und Aβ<sub>1-38</sub> die Rohwerte (Flächeneinheiten) der drei Banden pro Spur erfasst und als Quotienten aufeinander bezogen (Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub>, Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-38</sub>).

[0107] Die ECL-Detektion nach Western-Immunoblot (primärer mAb: 1E8) erfolgte mittels Belichtung von Hyper-

film™ über 5 min. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels Laserscannern (Epson GT 9000) und Auswertesoftware (Fa. Biometra, BioDoc software).

### 3.6.4 Quantifizierung des ECL-Signals mittels CCD-Kamera

#### 3.6.4.1 Materialien und Geräte

[1018] Bio-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA): Fluor-S MAX Multimager System (Best.-Nr. 170-7720); Quantity One Software (Best.-Nr. 170-8601)

#### 3.6.4.2 ECL-Entwicklung

[1019] Die ECL-Entwicklung wurde wie unter 3.6.3.2 beschrieben durchgeführt.

#### 3.6.4.3 Durchführung

[1010] Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Liquorprobe. Jedes Gel führte eine Verdünnungsreihe eines Gemisches der synthetischen Aβ-Peptide 1-37, 1-38, 1-39, 1-40 und 1-42 (Aβ<sub>1-37</sub>: 5, 10, 20, 40, 80 pg; Aβ<sub>1-38</sub>: 15, 30, 60, 90, 120 pg; Aβ<sub>1-39</sub>: 5, 10, 20, 30, 60 pg; Aβ<sub>1-40</sub>: 25, 50, 100, 200, 300 pg; Aβ<sub>1-42</sub>: 5, 10, 20, 40, 80 pg). Die ECL-Detektion mittels CCD-Kamera erfolgte bei einer Auflösung von 80x80 µm mittels serieller Expositionszeiten für 5, 20, 60 und 120 Sekunden. Für die Quantifizierung der Gele relativ zu ihrer jeweiligen Eichreihe wurde die Auswertesoftware "Quantity One" (Fa. Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) eingesetzt.

[1011] Die Messungen wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der Aβ-Peptid Konzentrationen erfolgte für jedes Gel anhand seiner Eichreihe. Anschließend wurde der Mittelwert (n=4) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Der Intraassay-Variationskoeffizient wurde anhand der vier Einfachbestimmungen berechnet, die auf jeweils getrennten Gelen im gleichen Experiment unter Verwendung identischer Stamm Lösungen bestimmt wurden. Der Interassay-Variationskoeffizient wurde anhand der Mittelwerte bestimmt, die in unabhängigen Experimenten (d. h. Untersuchungstagen) ermittelt wurden. Mittels Vierfachbestimmung ermittelte Ausreißer wurden bei Berechnung beider Variationskoeffizienten nicht eliminiert, d.h. alle technisch auswertbaren Aβ-Peptidbanden gingen in die Berechnung ein.

### 3.7 Telenzephal Primärkultur des Hühnchens

[1012] Eier der Hühnerrasse White Leghorn werden bei 37°C im Brutschrank über 10 Tage bebrütet. Am 10. Tag wird der Hühnerembryo unter sterilen Bedingungen entnommen und das Gehirn freipräpariert. Die vorderen Hirnbläschen werden abgetrennt, von den anliegenden Meningen befreit und in HEPES-gepuffertem DMEM aufgefangen. Das so gewonnene Gewebe wird über 15 Minuten einem Trypsinverdaul unterzogen und nach dreimaligem Waschen mit DMEM mehrfach durch eine Kanüle aufgezogen. Nach fünfminütiger Zentrifugation des Homogenats bei 550g wird der Überstand dekantiert, das Pellet in Kultivationsmedium (DMEM +5% Fetales Kälberserum + 5% Hühnerserum) aufgenommen und erneut durch eine Kanüle aufgezogen. Im Anschluß an eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer wird die Zelldichte der Suspension auf 1.5 Mio. Zellen/ml eingestellt und diese in die Kultivationsgefäße ausplattiert, so dass sich eine Zelldichte von 375.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ergibt. Zur Verbesserung der Zellanheftung wurden die Kultivationsgefäße zuvor über 24 Stunden mit einer Poly-L-Lösung (0,1mg/ml Poly-L-Lysin in 0,1M Borat/NaOH-Puffer, sterilfiltriert, pH 8,4) beschichtet. Am 2. Kultivationsstag erfolgt ein 50%iger Mediumwechsel, am 5. Kultivationsstag ein 100%iger Medienwechsel unter gleichzeitiger Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz. Die Inkubationszeiten können bis zu 48 Stunden betragen.

### 3.8 Gewinnung von Liquor

[1013] Drei bis 10 ml lumbaler Liquor wurde mittels lumbaler Liquorpunktion gewonnen und in Polypropylen Probengefäßen aufgefangen. Nach Zentrifugation (1000g, 10 min, 4° C) wurden die Proben innerhalb von 24 Stunden in Aliquots von 150 µl bis zur Bestimmung bei -80°C in Polypropylengefäßen (Eppendorf, 1,5 ml) gelagert. Die Proben dürfen nicht mehrfach eingefroren und aufgetaut werden.

### 3.9 Patienten

[1014] Insgesamt wurde der lumbale Liquor bei 130 Patienten untersucht. Bei fünf dieser Patienten wurden Aβ-Peptide zusätzlich im Blutplasma gemessen. Die Patienten verteilen sich auf die beiden diagnostischen Obergruppen

Neuropsychiatrische Erkrankungen ausschließlich Alzheimer-Demenz ("neuropsychiatric disease controls", NDC) und Patienten mit klinisch wahrscheinlicher (sporadischer) Alzheimer-Demenz (AD). Methodisch bedingt wurden mehrere NDC- und AD-Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Patienten untersucht, wobei zusammengehörige Patientengruppen durch eine fortlaufende arabische Nummerierung gekennzeichnet sind (z.B. NDC-1, AD-1). Die Kollektive NDC-1 und NDC-2 enthalten auch Patienten mit dementiellen Erkrankungen anderer Genese als AD. Das Kollektiv NDC-3 enthält nur Patienten mit nicht-dementiellen neuropsychiatrischen Erkrankungen. Dieses Kollektiv wurde differenziert in Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS ("chronic inflammatory CNS disease", CID-3) und den verbleibenden Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen ("other neuropsychiatric diseases", OND-3). Innerhalb der OND-3 und der AD-3 Gruppe wurde weiter in Abhängigkeit des ApoE  $\epsilon 4$ -Genotypus differenziert. Fig. 1 gibt einen Überblick über die Patientengruppen und ihre hierarchische Zuordnung. Tabelle 10a-d nennt die Patienten, die sich gleichzeitig in mehreren Patientengruppen befinden.

[0115] Die klinische Diagnostik erfolgte gemäß ICD-10. Die Diagnose einer Alzheimer Demenz wurde gemäß den international überwiegend verwendeten Kriterien der "Work Group of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS)" und der Richtlinien des "Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ARDA)" vorgenommen (McKhann et al., 1984). Die Proben wurden ausschließlich innerhalb der klinischen Routinediagnostik gewonnen. Für die hier vorgestellten Messungen wurde kein zusätzliches Liquorvolumen gewonnen. Entsprechend konnte die retrospektive Untersuchung nur erfolgen, wenn nach abgeschlossener Routinediagnostik noch aliquotierter Liquor zur Verfügung stand.

### 3.9.1 NDC-1 und AD-1

[0116] A $\beta$ -Peptide wurden im lumbalen Liquor bei 65 Patienten mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung quantifiziert. Die Probenaufnahme der zuvor nach Liquorpunktion und Zentrifugation nativ eingefrorenen Proben folgte gemäß 3.2.2a. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 12 dargestellt und in Tabelle 13 zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10a und 10c.

- NDC-1: n = 30, Alter =  $59.2 \pm 12.6$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 19/11 (weiblich/männlich).
- AD-1: n = 35, Alter =  $69.7 \pm 8.8$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 18/17 (weiblich/männlich). Zehn der AD-1 und 20 der NDC-1 Patienten wurden vergleichend mittels Immunopräzipitation (mAb 6E10, IP ohne Detergentien) und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 untersucht (vergl. Tabelle 12 und 13). Alle Patienten des Kollektivs AD-1 wurden vergleichend mit einem kommerziellem ELISA $A\beta_{1-42}$  untersucht (vergl. Tabelle 13).

### 3.9.2 NDC-2<sup>KP</sup>

[0117] Bei zehn Patienten wurde die Konzentration von A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  im lumbalen Liquor in Abhängigkeit der Probenvorbereitung mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung untersucht. Dabei wurde das Ausmaß der kaltepräzipitationsbedingten Erniedrigung (KP) von A $\beta$ -Peptiden untersucht. Die Proben der Patienten wurden nach Liquorpunktion und Zentrifugation aliquotiert. Ein Aliquot wurde vor dem Einfrieren mit SDS-/Hitzedenaturierung gemäß 3.2.2a vorbehandelt, im folgenden A $\beta_{1-40}$ SDS oder A $\beta_{1-42}$ SDS genannt. Das andere Aliquot wurde ohne Vorbehandlung bei -80° C eingefroren, im folgenden A $\beta_{1-40}$ nativ oder A $\beta_{1-42}$ nativ genannt. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 16a und 16b zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10a.

- NDC-2<sup>KP</sup>: n = 10, Alter =  $45.8 \pm 13.4$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 6/4 (weiblich/männlich)

### 3.9.3 NDC-3 und AD-3 mit Untergruppen

[0118] Bei 49 Patienten des Kollektivs NDC-3 und 12 Patienten des Kollektivs AD-3 wurde die Konzentration der A $\beta$ -Peptide im lumbalen Liquor mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera untersucht. Die Probenaufnahme der nach Liquorpunktion und Zentrifugation nativ eingefrorenen Proben folgte gemäß 3.2.2a. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 19 dargestellt und in Tabelle 20 zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10b, c und d.

- NDC-3: n = 47, Alter =  $45.2 \pm 15.8$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 19/28 (weiblich/männlich);
- AD-3: n = 12, Alter =  $73.0 \pm 7.9$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 9/3 (weiblich/männlich).

[0119] Innerhalb des Kollektivs NDC-3 wurden in Abhängigkeit von Art der Probe und Probenvorbereitung weitere

Untergruppen gebildet: Gepaarte Liquor- und EDTA Plasmaproben wurden bei fünf der NDC-3 Patienten gewonnen. Diese Proben wurden mittels Immunopräzipitation (RIPA-IP, 1E8) untersucht und werden nachfolgend IP-CSF-3 und IP-Plasma-3 genannt. Vergleichend wurden die Konzentrationen der ohne vorherige Immunopräzipitation gemessenen A $\beta$ -Peptide für die letztgenannten fünf Patienten als das Kollektiv SDS-CSF-3 zusammengefaßt (vergl. Tabelle 20).

Bei 27 der NDC-3 Patienten wurde die Konzentration von A $\beta_{1-42}$  im Liquor vergleichend mit einem kommerziellem ELISA (Hulstaert et al., 1999) bestimmt. Innerhalb des Kollektivs NDC-3 wurde zwischen Patienten mit chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen ("chronic inflammatory CNS disease", CID) und Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen ("other neuropsychiatric disease", OND) differenziert.

- OND-3: n=37, Alter =  $45.3 \pm 16.4$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 15/22 (weiblich/männlich).
- CID-3: n=10, Alter =  $44.9 \pm 14.2$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 4/6 (weiblich/männlich).

[0120] Das CID-3 Kollektiv setzte sich aus fünf Patienten mit Multipler Sklerose und fünf Patienten mit unklarer Ätiologie des chronisch entzündlichen ZNS-Prozesses zusammen.

[0121] Das Kollektiv OND-3 wird in Abhängigkeit des ApoE  $\epsilon 4$  Genotypus weiter in die Gruppen OND-3 $\epsilon 4^{plus}$  (n=6) und OND-3 $\epsilon 4^{minus}$  (n=30) differenziert. Patienten der Gruppe OND-3 $\epsilon 4^{plus}$  haben ein oder zwei Allele  $\epsilon 4$ , Patienten der Gruppe OND-3 $\epsilon 4^{minus}$  fehlt dieses Allel. Da 11/12 AD-3 Patienten ein oder zwei ApoE  $\epsilon 4$  Allele tragen, kann der Einfluß des  $\epsilon 4$  Allels auf das Liquormuster der A $\beta$ -Peptide nicht eliminiert werden, aber  $\epsilon 4$  unabhängige und daher mehr AD-spezifische Effekte wurden durch den Vergleich der Patientengruppen AD-3 $\epsilon 4^{plus}$  (n=11) und OND-3 $\epsilon 4^{plus}$  (n=6) ermittelt.

[0122] Die Werte zu den MMSE Testergebnissen der Patienten, Häufigkeiten der ApoE  $\epsilon 4$  Allele, sowie absolute und relative A $\beta$ -Peptid Liquorkonzentrationen sind für die Gruppen NCD-3, AD-3, IP-plasma-3, IP-CSF-3, and SDS-CSF-3 in Tabelle 20 zusammengefaßt.

### 3.9.4 NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup>

[0123] Bei 15 Patienten der Gruppe NDC-3 und 9 Patienten der Gruppe AD-3 wurde die kältepräzipitationsbedingte Ermiedrigung (KP) von A $\beta_{1-42}$  im lumbalen Liquor vergleichend mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera untersucht. Die Kollektive werden im folgenden NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup> genannt. NDC-3<sup>KP</sup> ist vollständig Teilkollektiv von NDC-3. AD-3<sup>KP</sup> (n=11) enthält neben neun Patienten von Kollektiv AD-3 zusätzlich zwei weitere Patienten (NP69, NP197). Die Probenvorbereitung für die Bestimmung von A $\beta_{1-42}$  nativ und A $\beta_{1-42}$ SDS erfolgte wie für das Kollektiv NDC-2<sup>KP</sup> beschrieben.

[0124] Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 21 zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10b, c und d.

- NDC-3<sup>KP</sup>: n=15, Alter =  $44.6 \pm 15.0$  (MW $\pm$ SD), Geschlecht: 5/10 (weiblich/männlich).
- AD-3<sup>KP</sup>: n = 11, Alter =  $70.9 \pm 9.0$  (MW $\pm$ SD), Geschlecht: 9/2 (weiblich/männlich).

### 3.10 Statistik

[0125] Die Testung auf signifikante Differenzen zwischen unabhängigen Stichproben erfolgte über den Mann-Whitney U-Test und für abhängige (gepaarte) Stichproben über den Wilcoxon-Test. Die nicht-parametrische Regressionsanalyse erfolgte nach Spearman (Korrelationskoeffizient rho oder R). Als Statistiksoftware wurde Statistika (Version 5.0) eingesetzt. Die iterative Berechnung von diagnostischer Spezifität und Sensitivität für die Diagnosestellung AD in Abhängigkeit unterschiedlicher A $\beta$ -Peptidgrenzwerte wurde über eine "receiver operating characteristic (ROC) curve" vorgenommen (Metz, 1978). Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde auf p<0.05 festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auftrennung und Nachweis von sAPPa und A $\beta$ -Peptiden

#### 4.1.1 A $\beta$ -SDS-PAGE

[0126] Mittels A $\beta$ -SDS-PAGE lassen sich folgende synthetische A $\beta$ -Peptide durch hamstoffinduzierte Konformationsänderung von kathodisch (oben) nach anodisch (unten) trennen:

1-33 / 1-34  
1-35

1-37  
1-38  
1-39  
1-42 / 2-40 / 3-40  
2-42 / 3-42  
3p-42\* / 3p-40\*

\* p = Pyroglutamatderivate;

[0127] A $\beta$ -Peptide mit fehlender oder nur partieller Trennung stehen in einer Zeile. Der Nachweis erfolgte mittels Silberfärbung der Trenngel.

[0128] Mittels A $\beta$ -IPG-2D-PAGE können die A $\beta$ -Peptide 2-40 / 3-40 von 1-42 getrennt werden, da das Fehlen von Aspartat den isoelektrischen Punkt um eine pH-Einheit von 5.37 nach 6.37 verschiebt (vergl. Fig. 2a&c und Fig. 24a).

[0129] Der gleiche pH-Sprung zeigt sich für die A $\beta$ -Peptide 2-42 / 3-42 in Bezug auf 1-42. Zwischen 2-40/2-42 und 3-40/3-42 kann über die N-terminal selektiven mAbs 1E8 und 6E10 differenziert werden (vergl. 3.1.2). Bemerkenswert ist, dass N- und C-terminale Veränderungen der A $\beta$ -Peptide, die zu einem erhöhtem Aggregationsverhalten führen (N-terminal: Fehlen von Aspartat und Pyroglutamatbildung; C-terminal: Verlängerung um hydrophobe Aminosäuren) auch zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität im hamstoffhaltigen Trennsystem führen. Damit besteht eine Analogie zwischen den Struktur-Aktivitätsfunktionen *in vitro* und *in vivo*.

[0130] Vergleichsweise geringfügige Veränderungen der Trenngelmatrix (Polyacrylamid Porengröße, Molarität des Hamstoffs, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke) und der kathodischen SDS-Konzentration verändern signifikant das absolute und relative Laufverhalten der A $\beta$ -Peptide. Veränderungen der Gesamtkonzentration an Acrylamidmonomer (T%) oder des Anteils an Bisacrylamid an der Gesamtkonzentration (%C) um nur 1-2% bei sonst konstanten Bedingungen sind dafür ausreichend. Gleichfalls führt die selektive Reduktion der Hamstoffkonzentration von 8 auf 7 Mol/L oder die Reduktion der kathodischen SDS-Konzentration von 0.25% (w/v) auf 0.1% zu einer veränderten Auftrennung.

[0131] Mittels A $\beta$ -SDS-PAGE wird im oberen (kathodischen) Kompartiment im hamstoffhaltigen Trenngel sAPP $\alpha$  aufgetrennt, dass mittels Western-Immunoblot-1/2 (mAb 1E8) nachgewiesen werden kann (vergl. Fig. 3). Bedingt durch die Molmasse von > 100000 werden sAPP $\alpha$  Isoformen im Vergleich zu den A $\beta$ -Peptiden weniger effektiv und mit wesentlich höherer Varianz aus den kleinporigen hamstoffhaltigen Trenngelen auf die Nachweismembran gelbottet (Intraassay-Variationskoeffizient im Liquor > 20%).

[0132] Biotteffizienz und Auftrennung der sAPP $\alpha$  Isoformen können aber wesentlich verbessert werden, wenn das hamstoffhaltige Trennsystem mit einem kathodischen nichthamstoffhaltigen Trenngelkompartiment höherer Porengröße aber sonst gleicher Pufferszusammensetzung kombiniert wird (10 T%, 5 C%, kein Hamstoff). Bei unveränderter Trenngelgröße des hamstoffhaltigen Kompartiments wird die Qualität der A $\beta$ -Peptidauftrennung nicht beeinträchtigt, da die A $\beta$ -Peptide das großporige Kompartiment noch konzentriert innerhalb der "moving boundary" durchlaufen.

[0133] Die Quantifizierung von sAPP $\alpha$  mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera erscheint für die neurochemische Demenzdiagnostik vielversprechend, da sAPP $\alpha$  bei AD im Liquor erniedrigt gefunden wurde und den  $\alpha$ -Sekretase Schnitt abbildet. Damit erlaubt der A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot die Berechnung von sAPP $\alpha$ /A $\beta$ -Peptid Quotienten, die ein Maß für das Verhältnis von  $\alpha$ -Sekretase zu  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretaseaktivität darstellen.

#### 4.1.2 Western-Immunoblot-1/2

[0134] Der mAb 1E8 zeigt im Western-Immunoblot-1/2 eine erstaunlich hohe N-terminale Spezifität, da im unteren pg-Bereich (<200 pg) nur A $\beta$ -Peptide nachweisbar sind, die N-terminal maximal um eine Aminosäure (Aspartat) verkürzt sind. Entsprechend werden die A $\beta$ -Peptide 3-40, 3p-40, 3-42 und 3p-42 mittels des mAb 1E8 nicht nachgewiesen. Hier gelingt der Nachweis mittels des N-terminal spezifischen mAb 6E10, der kommerziell erhältlich ist, aber in Abhängigkeit der Blotbedingungen etwa zehn- bis dreißigfach weniger empfindlich detektiert.

[0135] Die Nachweisempfindlichkeit des Western-Immunoblot-1 (Milchpulver-Block, mAb 1E8) liegt bei 1 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 2 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Filmexposition und bei 3 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 6 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Die Nachweisempfindlichkeit des Western-Immunoblot-2 (Roti-Block, mAb 1E8) liegt bei 0.3 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 0.6 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Filmexposition und bei 1 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 2 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Durch Entwicklung des Western-Immunoblot-2 konnte die im Vergleich zur Filmexposition etwa dreifach geringere Empfindlichkeit der CCD-Kamera kompensiert werden. Die Nachweisempfindlichkeit des kommerziell erhältlichen N-terminal selektiven mAb 6E10 liegt bei Western-Immunoblot mit Milchpulver-Block bei 10 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 20 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Filmexposition und bei 30 pg (A $\beta_{1-40}$ ) bis 60 pg (A $\beta_{1-42}$ ) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Der mAb 6E10 kann nicht mit Rotiblock verwendet werden. Damit konnte die Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem mAb 6E10 um bis zu 30-fach gesteigert werden.

[0136] SDS-PAGE Trennsysteme mit 8 M Hamstoff können unabhängig von den verwendeten Geldimensionen mit maximal etwa 5  $\mu$ l Liquor pro mm<sup>2</sup> Geloberfläche beladen werden, wenn bei nahezu allen Patientenproben eine

optimale elektrophoretische Trennung realisiert werden soll. Dabei handelt es sich um nativ eingefrorenen und anschließend SDS-/Hitzedenaturierten Liquor oder um Liquor, der vor dem Einfrieren SDS-/Hitzedenaturiert wurde. 5 µl pro mm<sup>2</sup> entsprechen bei dem verwendeten Minigelsystem einem Liquorvolumen von etwa 10 µl. Damit ergibt sich Empfindlichkeit von 200 pg/ml für den Nachweis von Aβ<sub>1-42</sub> im humanen Liquor mittels Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera. Eine Nachweisempfindlichkeit von mindestens 200 pg/ml ist Voraussetzung für die neurochemische Demenzdiagnostik der AD mittels Bestimmung der Aβ-Peptide im Liquor und kann beispielsweise mit dem kommerziell erhältlichen mAb E610 nicht realisiert werden.

[0137] Bei Kombination von Immunopräzipitation (RIPA-Detergentien, mAb 1 E8) mit Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera steigt die Empfindlichkeit für den Nachweis von Aβ<sub>1-42</sub> auf < 10 pg/ml. Dies ist Voraussetzung für die Quantifizierung von Aβ-Peptiden im Plasma mittels Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot. Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten für den Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung finden sich in Tabelle 11. Die entsprechenden Variationskoeffizienten für den Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit CCD-Kamera finden sich in Tabelle 18a und b. Für die Quantifizierung von 20 pg Aβ-Peptid wurden Intra- und Interassayvariationskoeffizienten von jeweils weniger als 10% ermittelt.

[0138] Die Quantifizierung mittels CCD-Kamera bietet erhebliche Vorteile gegenüber der Filmexposition. Das Lichtsignal kann hier über 3,8 Zehnerpotenzen linear aufgenommen werden und zusätzlich kann die Zeitdauer der Signalaufnahme über einen weiten Bereich exakt gesteuert werden. Entsprechend können APP-Metabolite mit großer Differenz ihrer Signalintensität, wie z.B. sAPPα und Aβ<sub>1-42</sub>, über zwei Messzeiten (z.B. 10 s und 3 min) quantifiziert werden.

#### 4.2 Patientenproben

[0139] Bisher war bekannt, dass Aβ<sub>1-40</sub> und Aβ<sub>1-42</sub> regelhaft und in höherer Konzentration im humanem Liquor vorkommen. Sowohl bei Direktauftrag nach SDS-/Hitzedenaturierung als auch nach vorheriger Immunopräzipitation unter Verwendung N-terminal selektiver Antikörper kann dagegen mittels Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-1/2 regelhaft ein charakteristisches Aβ-Peptidquintett im humanen lumbalen Liquor nachgewiesen werden (Fig. 3). Oberhalb (kathodenseitig) von Aβ<sub>1-40</sub> kommen drei weitere Aβ-Peptide zur Darstellung, die initial als Aβ1-x<sup>a</sup>, Aβ1-x<sup>b</sup> und Aβ1-x<sup>c</sup> bezeichnet wurden und mittels Aβ-IPG-2D-PAGE/Immunoblot mit Komigration synthetischer Aβ-Peptide als Aβ<sub>1-37/38/39</sub> identifiziert werden konnten (Fig. 2). Die Aβ-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 sind bei carboxyterminal selektiver Immunopräzipitation gegen 1-40 und 1-42 im Liquor mittels Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot nicht nachweisbar. Neben den Aβ-Peptiden 1-33, 1-34 und 1-35 konnten die Aβ-Peptide 1-37/38/39 im humanem Liquor mittels MALDI-TOF nachgewiesen werden. Die Aβ-Peptide 1-33/1-34 und 1-35 sind im Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot oberhalb (kathodenseitig) von 1-37 bei den Patienten im Liquor in der Regel nur an der Nachweisgrenze detektierbar oder nicht nachweisbar. Die Aβ-Peptide 1-37, 1-38, 1-39, 1-40 und 1-42 sind hochgradig und signifikant korreliert, wie aus Fig. 10 entnommen werden kann. Dies spricht für eine enge enzymatische Regulation ihrer Entstehung. Die synthetischen Aβ-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 standen bei Untersuchung der ersten Patientenkollektive (NCD-1, AD-1, NDC-2<sup>EP</sup>) noch nicht zur Verfügung. Daher wurde hier das Verhältnis Aβ<sub>1-42</sub> zu Aβ<sub>1-38</sub> über den Quotienten der densitometrisch ermittelten Flächeneinheiten der jeweiligen Banden einer Gelspur ermittelt. Zum Vergleich wurde auch der Quotient Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub> über die Flächeneinheiten ausgedrückt. Da Aβ<sub>1-38</sub>, Aβ<sub>1-40</sub> und Aβ<sub>1-42</sub> bei gleicher Konzentration und gleichen Bedingungen im Western-Immunoblot eine unterschiedliche Intensität des ECL-Signals zeigen, können die Quotienten der Flächeneinheiten nicht mit den entsprechenden Quotienten der über die Eichgrade ermittelten Aβ-Peptidkonzentrationen gleichgesetzt werden.

[0140] Bei einem Teil der Patienten mit AD wird unterhalb (anodisch) von Aβ<sub>1-42</sub> mittels Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera eine zusätzliche Bande mit dem Retentionsfaktor (Rf) von Aβ<sub>2-42</sub> nachweisbar (Fig. 23a). Diese Bande konnte im Liquor bei AD nach vorheriger Immunopräzipitation (RIPA-IP, mAb 1 E8) mittels Aβ-IPG-2D-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera als Aβ<sub>2-42</sub> identifiziert werden (Fig. 24b). Bei nicht-dementen Kontrollpatienten konnte Aβ<sub>2-42</sub> bisher nicht nachgewiesen werden. Aβ<sub>2-42</sub> ist auch mit typischer himmregionaler Verteilung bei Patienten mit sporadischer AD intrazerebral massiv erhöht (vergl. 4.2.5). Für die Bestimmung von Aβ-Peptiden im Liquor bei den unter 3.9 genannten Patientenkollektiven stand noch kein synthetisches Aβ<sub>2-42</sub> zur Verfügung. Entsprechend liegen für diese Patienten keine quantitativen Daten zu Aβ<sub>2-42</sub> vor. Zwischenzeitlich wurde aber ein weiteres Patientenkollektiv Patienten gemessen, das unter 3.9 noch nicht aufgeführt ist. Bei einigen der Patienten mit AD-4, bei einigen Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen als AD (nAD-4) und bei einigen Patienten mit nicht-dementiellen Erkrankungen (NDC-4) war Aβ<sub>2-42</sub> nachweisbar. Zusätzlich war der Quotient Aβ<sub>1-42</sub>/Aβ<sub>1-40</sub> bei den Aβ<sub>2-42</sub> positiven Patienten im Vergleich zu den übrigen Patienten signifikant erniedrigt.

##### 4.2.1 NDC-1 und AD-1

[0141] Tabelle 12 gibt die klinischen Daten und individuellen Meßwerte der Patienten und Tabelle 13 faßt die stati-

stischen Kennwerte der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1 zusammen. Die Analyse der Liquorproben erfolgte mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung.

[0142] Die signifikante Erniedrigung von A $\beta$ 1-42 in humanem lumbalen Liquor bei Patienten mit AD-1 im Vergleich zu NDC-1 geht aus Fig. 4 hervor. A $\beta$ 1-40 ist bei AD-1 gleichfalls signifikant erniedrigt, aber nicht in dem Ausmaß wie dies für A $\beta$ 1-42 deutlich wird (vergl. Tabelle 14). Entsprechend ist auch der Quotient A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 hochsignifikant erniedrigt (Fig. 5, Tabelle 14). Bisher nicht beschrieben wurde die gleichfalls hochsignifikante Erniedrigung des Quotienten A $\beta$ 1-42/ A $\beta$ 1-38 (Fig. 6, Tabelle 14). Die Grenzwerte für den Gruppenvergleich AD-3 versus NDC-3 wurden für A $\beta$ 1-42 und die beiden letztgenannten A $\beta$ -Peptidquotienten über die jeweiligen "receiver operating characteristics (ROC)" ermittelt (Tabelle 15). Die Differenzierung der Patientenkollektive AD-1 versus NDC-1 bei einem Grenzwert von 802,5 pg/ml A $\beta$ 1-42 war mit einer Spezifität von 74% und einer Sensitivität von 87% durchführbar. Der Quotient A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 hat eine diagnostische Spezifität von 71% und eine Sensitivität von 93% für die Differenzierung der Kollektive AD-1 versus NDC-1. Die entsprechende Spezifität und Sensitivität für den Quotienten A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-38 beträgt 84% und 0.86%.

[0143] Vergleichend wurde A $\beta$ 1-42 nach Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung untersucht. Wie aus Fig. 7 und Tabelle 14 hervorgeht, differenziert A $\beta$ 1-42 nach vorheriger IP weniger gut die Patientenkollektive AD-1 und NDC-1. Die nach Immunopräzipitation und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung ermittelte Konzentration von A $\beta$ 1-42 im Liquor bei einem Teilkollektiv der Patienten mit AD-1 stimmt gut mit der Konzentration überein, die mittels des kommerziellen ELISAA $\beta$ 1-42 (Huistaert et al., 1999) bei AD-1 ermittelt wurde (Tabelle 13). Gleichzeitig stimmt der ELISA Mittelwert bei AD-1 (412 pg/ml) gut mit dem ELISA Medianwerten bei AD (428 und 487 pg/ml) überein, die in einer internationalen Multizenterstudie ermittelt wurden (Huistaert et al., 1999).

[0144] Der Vergleich der Konzentrationen von A $\beta$ 1-42 im Liquor in Abhängigkeit der Meßmethodik (SDS-/Hitzenaturierung mit A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 versus Immunopräzipitation mit A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 oder ELISAA $\beta$ 1-42) macht deutlich, dass mittels SDS-/Hitzenaturierung wesentlich mehr A $\beta$ 1-42 aus dem Liquor extrahiert werden kann als über die Antikörper-abhängigen Verfahren (Immunopräzipitation und ELISA). Im Vergleich zur Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) werden nach SDS-/Hitzenaturierung im Mittel 2,3-fach und im Vergleich zum ELISA (ohne Detergenz) 1,8-fach höhere Konzentrationen von A $\beta$ 1-42 im Liquor bei AD gemessen. Weiter unten wird gezeigt, dass diese Differenz zwischen ELISA und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot bei NDC-Patienten noch höher ausfällt (vergl. NDC-3).

#### 4.2.2 NDC-3 und AD-3

[0145] Tabelle 19 gibt die klinischen Daten und individuellen Meßwerte der Patienten und Tabelle 20 faßt die statistischen Kennwerte der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1 zusammen. Die Analyse der Liquorproben erfolgte mittels A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera.

##### 4.2.2.1 Abhängigkeit der A $\beta$ -Peptid Konzentration im Liquor von der Art der Probenvorbereitung

[0146] Bei fünf Patienten des NDC-3 Kollektivs wurden Aliquots von Liquor vergleichend mit vorheriger Immunopräzipitation (RIPA-IP, mAb 1E8) bzw. mit direkter Probenaufnahme (SDS-/Hitzenaturierung) untersucht (vergl. Tabelle 20). Nach SDS-/Hitzenaturierung ergeben sich etwas höhere A $\beta$ -Peptid Konzentrationen. Dieser Effekt ist betont für A $\beta$ 1-38 und A $\beta$ 1-42, erreicht aber nicht das Signifikanzniveau. Entsprechend werden mit beiden Methoden der Probenvorbereitung vergleichbare A $\beta$ -Peptidspiegel im Liquor gemessen, wenn die Immunopräzipitation mit Detergentien durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu wird bei 27 der NDC-3 Patienten mit dem kommerziellen ELISAA $\beta$ 1-42 (ohne Detergenz) im Vergleich zu SDS-/Hitzenaturierung und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit CCD-Kamera ein ca. 3-fach tieferer Spiegel für A $\beta$ 1-42 gemessen.

[0147] Weiter oben wurde für Patienten des AD-1 Kollektivs nachgewiesen (vergl. 4.2.1), dass mit Immunopräzipitation (mAb 6E10) und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 deutlich tiefere und mit dem ELISAA $\beta$ 1-42 vergleichbare Konzentrationen gemessen werden, wenn die Immunopräzipitation ohne Detergenz durchgeführt wird.

[0148] Damit ergibt sich der Hinweis, dass A $\beta$ 1-42 im humanen Liquor in einer Fraktion vorliegt, die monoklonalen Antikörpern ohne vorherige Behandlung mit Detergentien nur zum Teil zugänglich ist.

[0149] Die eingesetzten Detergentien können Peptide aus nicht-kovalenten Protein-Peptidbindungen - beispielsweise bedingt durch hydrophobe Wechselwirkung - freisetzen. Entsprechend sind die höheren Liquorspiegel von A $\beta$ 1-42 nach Einsatz von Detergentien (SDS-/Hitzenaturierung, RIPA-IP) im Vergleich zu Verfahren ohne Einsatz von Detergentien (IP ohne Detergenz, ELISAA $\beta$ 1-42) wahrscheinlich durch hochaffine Bindung und Epitopmaskierung von A $\beta$ 1-42 an andere Proteine oder A $\beta$ -Peptidaggregate bedingt. Bei Verwendung von Detergentien ist erwartungsgemäß der Einsatz des ionischen Detergenz SDS bei höherer Konzentrationen (0.5% w/v) und Temperatur (95°C) noch effektiver als der RIPA-Detergentienmix.

[0150] Weiter unten wird nachgewiesen, dass A $\beta$ 1-42 im Vergleich zu A $\beta$ 1-40 besonders kältepräzipitationsempfindlich

ist und krankheitsspezifisch ein unterschiedliches Kältepräzipitationsverhalten bei Patienten mit AD und NDC zeigt (vergl. 4.2.4).

Synthetisches A $\beta$ <sub>1-42</sub> mit vergleichbarer Konzentration in Wasser gelöst zeigt dagegen eine deutlich geringere Kältepräzipitation. Damit wird wahrscheinlich, dass die Kältepräzipitationsbedingte Reduktion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> im humanen Liquor überwiegend auf den Aggregat-gebundenen Anteil des Peptids entfällt. Im Fall vergleichsweise hydrophober Aggregate - beispielsweise Lipoprotein-haltige Komplexe - wäre ein Verlust durch Kältepräzipitation nicht überraschend. In diesem Zusammenhang wird weiter unten gezeigt (4.2.4), dass  $\epsilon$ 4-positive Patienten des NDC-3KP Kollektivs eine besonders hohe Rate von KP-bedingter Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> zeigen und annähernd gleich tiefe Liquorspiegel wie  $\epsilon$ 4-positive AD-3KP Patienten haben. Annähernd gleich tiefe A $\beta$ <sub>1-42</sub> Liquorspiegel werden weiter unten auch für Patienten der Gruppen OND-3 $\epsilon$ 4plus und AD-3 $\epsilon$ 4plus nachgewiesen.

#### 4.2.2.2 A $\beta$ -Peptide im Plasma

[0151] Mittels Immunopräzipitation und A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot mit CCD-Kamera konnte das A $\beta$ -Peptidquintett auch im Plasma nachweisen werden. Im Vergleich zum Liquor sind die Konzentrationen im Plasma 30 bis 60-fach geringer und beide Kompartimente zeigen jeweils spezifische Muster der prozentualen A $\beta$ -Peptidanteile. Besonders das Verhältnis A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> ist ZNS-spezifisch unterschiedlich: Liquor 0.80 (0.79-0.92), Plasma 1.70 (1.69-1.75); Median (Quartil).

#### 4.2.2.3 Krankheitsspezifische A $\beta$ -Peptidmuster im Liquor und Einfluß des ApoE Genotyp

[0152] Fig. 8 zeigt in Abschnitt A die Konzentrationen der A $\beta$ -Peptide 1-37/38/39/40/42 im humanen Liquor der Patientengruppen OND-3, CID-3 und AD-3. In Abschnitt B ist der prozentuale Anteil der jeweiligen A $\beta$ -Peptidspecies an der Summe aller A $\beta$ -Peptide dargestellt. Die logarithmische Darstellung wurde gewählt, um die deutlich unterschiedlichen Liquorspiegel vergleichend darstellen zu können. Bei den Liquorkonzentrationen der A $\beta$ -Peptide fällt auf, dass das zweithäufigste A $\beta$ -Peptid im humanen Liquor nach A $\beta$ <sub>1-40</sub> nicht A $\beta$ <sub>1-42</sub> ist, sondern A $\beta$ <sub>1-38</sub>. Weiter ist bei AD-3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> erniedrigt. Die A $\beta$ -Peptidgesamtkonzentration der untersuchten Gruppen ist weitgehend identisch. Wesentliche deutlichere Unterschiede zwischen den Kollektiven werden dagegen bei Betrachtung der prozentualen A $\beta$ -Peptidanteile deutlich:

- CID-3 und AD-3 zeigen erhöhte Anteile von A $\beta$ <sub>1-38</sub>% und A $\beta$ <sub>1-39</sub>% im Vergleich zu OND-3
- A $\beta$ <sub>1-40</sub>% ist hochsignifikant bei AD-3 erhöht
- A $\beta$ <sub>1-42</sub>% ist hochsignifikant bei AD-3 erniedrigt und differenziert die Patienten mit AD deutlich besser als die zugehörige A $\beta$ -Peptidkonzentration

[0153] Aus der Literatur ist bekannt, dass bei familiären AD-Formen mit APP-Punktmutationen in Nähe der  $\beta$ -Sekretaseschnittstelle vermehrt A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> überexprimiert werden, dagegen bei Mutationen in Nähe der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle vermehrt A $\beta$ <sub>1-42</sub> anfällt und das Verhältnis A $\beta$ <sub>1-42</sub> zu A $\beta$ <sub>1-40</sub> deutlich ansteigt. Es kann daher angenommen werden, dass bei Betrachtung der prozentualen Anteile der A $\beta$ -Peptide vermehrt krankheitsspezifische Veränderungen der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität abgebildet werden.

[0154] In Fig. 9 A und B werden wie unter Fig. 8 beschrieben die Untergruppen OND-3 $\epsilon$ 4minus, OND-3 $\epsilon$ 4plus und AD-3 $\epsilon$ 4plus verglichen. Damit kann zwischen  $\epsilon$ 4- und AD-abhängigen Effekten auf das A $\beta$ -Peptid Muster im Liquor unterschieden werden. Bei OND-3 $\epsilon$ 4plus im Vergleich zu OND-3 $\epsilon$ 4minus sind tendentiell alle A $\beta$ -Peptide im Liquor erniedrigt und entsprechend auch die A $\beta$ -Peptidgesamtkonzentration (Abb 9A). Innerhalb des A $\beta$ -Peptidquintetts ist die Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> besonders deutlich. Bei AD-3 $\epsilon$ 4plus ist dagegen selektiv A $\beta$ <sub>1-42</sub> erniedrigt, allerdings in dem gleichen Ausmaß wie bei OND-3 $\epsilon$ 4plus. Die A $\beta$ -Peptidgesamtmenge ist hier nicht erniedrigt (Fig. 9A). Damit können die  $\epsilon$ 4-positiven NDC-3 Patienten nicht über die alleinige Bestimmung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> im Liquor von den  $\epsilon$ 4-positiven AD-3 Patienten getrennt werden. Dies ist jedoch über die prozentualen A $\beta$ -Peptidanteile möglich (Fig. 9B). Bedingt durch die selektive Erniedrigung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> bei AD-3 $\epsilon$ 4plus ist hier A $\beta$ <sub>1-42</sub>% besonders stark erniedrigt und das Kollektiv AD-3 $\epsilon$ 4plus kann über diesen Parameter ohne Überschneidung von den Gruppen OND-3 $\epsilon$ 4plus und OND-3 $\epsilon$ 4minus getrennt werden. Gleichzeitig ist der prozentuale Anteil von A $\beta$ <sub>1-40</sub> bei AD-3 $\epsilon$ 4plus besonders stark erhöht.

[0155] Wie aus der Korrelationsmatrix in Fig. 10 hervorgeht ist das A $\beta$ -Peptidquintett im Liquor eng miteinander korreliert und die prozentualen Anteile der A $\beta$ -peptide und ihrer Gesamtkonzentration haben für biologische Parameter erstaunlich geringe Variationskoeffizienten. Diese Befunde legen eine enge enzymatische Regulation der Konzentration der fünf A $\beta$ -Peptide durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase nahe. In diesem Zusammenhang wird weiter unten nachgewiesen (4.5.2), dass neben A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> besonders stark ausgeprägt die Entstehung der carboxyterminal verkürzten A $\beta$ -Peptide durch synthetische Inhibitoren der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase reduziert wird.

4.2.2.4 Krankheitsspezifische Muster der prozentualen A $\beta$ -Peptidanteile: Einzelfalldarstellung der Patientenkollektive

[0156] Aus Fig. 11-13 kann entnommen werden, dass über A $\beta$ <sub>1-38</sub>%, A $\beta$ <sub>1-40</sub>% und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% Patienten mit AD-3 und CID-3 von OND-3 Patienten differenziert werden können.

[0157] Fig. 11 weist eine signifikante negative Korrelation zwischen A $\beta$ <sub>1-38</sub>% und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% für AD-3 Patienten nach. Der AD-3 Patient 143 wurde bei der Berechnung der Regressionsgerade nicht berücksichtigt und wird hier, wie auch nachfolgend (vergl. Fig. 12 & 13), als Ausreißer identifiziert. Klinisch zeigte dieser Patient ein Frühstadium der AD (MMSE 27/30).

Differentialdiagnostisch war in der Vorgeschichte eine depressive Pseudodemenz diskutiert worden.

[0158] In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgeraden nimmt der Schweregrad der Demenz zu. Auf den Zusammenhang zwischen den prozentualen A $\beta$ -Peptidanteilen und Schweregrad der Demenz wird weiter unten näher eingegangen (vergl. Fig. 14 & 15). Bei einer Grenzkonzentration von A $\beta$ <sub>1-42</sub>% = 8.5 kann ohne Überschneidung das AD-3 Kollektiv von den Gruppen CID-3 und OND-3 getrennt werden. Der spezifische Zusammenhang zwischen A $\beta$ <sub>1-38</sub>% und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% bei AD liegt aber nahe, dass Patienten mit AD noch besser über eine Funktion ähnlich wie die Regressionsgerade zwischen A $\beta$ <sub>1-38</sub>% und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% differenziert werden können. Dies hat unmittelbare Relevanz für die neurochemische AD-Diagnostik, denn über die Regressionsgerade als Grenzlinie würde beispielsweise ein Patient mit A $\beta$ <sub>1-42</sub>% = 9.5 noch als AD erkannt, wenn gleichzeitig sein Wert für A $\beta$ <sub>1-38</sub>% 13.5 beträgt, wie von der Regressionsgerade vorhergesagt (vergl. Fig. 11). Entsprechendes gilt für den weiter unten gezeigten Zusammenhang zwischen den Quotienten A $\beta$ <sub>1-30</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> (Fig. 16). Die Grenzkonzentrationen für die Differenzierung des CID-3 Kollektivs lauten: A $\beta$ <sub>1-38</sub>% = 15.5 und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% = 9.6%. Auf diese Weise werden fälschlich sechs Patienten als CID-3 klassifiziert. Diese Patienten sind durch ihre Codierung identifiziert. Bemerkenswert ist, dass bei genauer Analyse der klinischen Befunde bei einigen dieser Patienten (3/6) retrospektiv ein chronisch-entzündlicher Prozess wahrscheinlich wird.

[0159] Fig. 12 zeigt A $\beta$ <sub>1-40</sub>% in Abhängigkeit von A $\beta$ <sub>1-42</sub>%. Eine AD-spezifische Korrelation zwischen diesen Parametern ist zwar signifikant (ohne Patient 143) aber weniger eng. Der Schweregrad der Demenz steigt in Pfeilrichtung. [0160] Die Grenzwertkonzentrationen für AD-3 sind: A $\beta$ <sub>1-40</sub>% = 63 und A $\beta$ <sub>1-42</sub>% = 8.5.

[0161] Fig. 13 zeigt A $\beta$ <sub>1-40</sub>% in Abhängigkeit von A $\beta$ <sub>1-38</sub>%.

[0162] Die Grenzwertlinien A $\beta$ <sub>1-38</sub>% = 15.5 und A $\beta$ <sub>1-40</sub>% = 60.0 beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Eine AD-spezifische Korrelation zwischen diesen Parametern ist signifikant (ohne Patient 143). Der Schweregrad der Demenz steigt in Pfeilrichtung. Die Grenzwertlinien A $\beta$ <sub>1-38</sub>% = 16.0 und A $\beta$ <sub>1-40</sub>% = 63 definieren AD-3 Patienten mit schwerer Demenz.

Bemerkenswert ist hier, dass kein NDC-3 Patient oberhalb von A $\beta$ <sub>1-40</sub>% = 63 liegt und der Schnittpunkt dieser Grenzwertlinie mit der Regressionsgeraden, gleichzeitig die Grenzwertlinie A $\beta$ <sub>1-38</sub>% = 16 vorher sagt.

[0163] Aus Fig. 14 wird deutlich, dass AD-3 Patienten mit A $\beta$ <sub>1-38</sub>% < 16.0 oder A $\beta$ <sub>1-40</sub>% > 63 überwiegend eine schwere Demenzausprägung zeigen (MMSE  $\leq$  10), andernfalls einen mittleren bis leichtgradigen Schweregrad der Demenz (MMSE > 10). Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei Patienten, die gleichzeitig beide Grenzwerte unter- bzw. überschreiten (Fig. 14; vergl. auch Fig. 13).

[0164] Die Korrelationsmatrix für den Zusammenhang zwischen den prozentualen A $\beta$ -Peptidanteilen und Schweregrad der Demenz ist in Fig. 15 dargestellt. Signifikante Zusammenhänge finden sich für A $\beta$ <sub>1-31</sub>% und A $\beta$ <sub>1-40</sub>%. Auffällig ist, dass die Gruppe der carboxyterminal verkürzten A $\beta$ -Peptide im Gegensatz zu A $\beta$ <sub>1-40</sub>% positive Korrelationskoeffizienten für den letztgenannten Zusammenhang zeigt. Zwischen den absoluten Konzentrationen der A $\beta$ -Peptide im Liquor und dem Schweregrad der Demenz wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden, d.h. auch hier werden krankheitsspezifische Zusammenhänge erst bei Betrachtung der prozentualen A $\beta$ -Peptidanteile deutlich.

4.2.2.5 Krankheitsspezifische Muster von A $\beta$ -Peptidquotienten: Einzelfalldarstellung der Patientenkollektive

4.2.2.5 Krankheitsspezifische Muster von A $\beta$ -Peptidquotienten: Einzelfalldarstellung der Patientenkollektive

[0165] Die A $\beta$ -Peptidquotienten A $\beta$ <sub>1-38</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> erlauben eine Differenzierung zwischen den Kollektiven AD-3, CID-3 und OND-3. Dies hat den Vorteil, dass jetzt nur drei A $\beta$ -Peptide quantifiziert werden müssen, um die drei Patientenkollektive zu differenzieren, führt aber zu einem gewissen Verlust an diagnostischer Trennschärfe. Damit bietet sich an, für die neurochemische Demenzdiagnostik und Identifizierung von Patienten mit chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen ein ELISA-Triplett zu entwickeln (A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>). Dieser Ansatz sollte mit einer detergenten-abhängigen Probenvorbereitung kombiniert werden (vergl. 4.2.4).

[0166] Fig. 16 zeigt A $\beta$ <sub>1-38</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> in Abhängigkeit von A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub>. Es besteht ein signifikanter und spezifischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern bei AD. In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgeraden nimmt die Schwere der Demenz zu (vergl. Fig. 18). Über die Grenzwertlinie A $\beta$ <sub>1-38</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> = -0.5 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub>) + 0.52 wird erneut Patient 143 als Ausreißer identifiziert. Die übrigen AD-3 Patienten werden korrekt klassifiziert und kein NDC-3 Patient wird fälschlich dem Kollektiv AD-3 zugeordnet. Die Grenzwertlinien A $\beta$ <sub>1-38</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> = 0.26 und A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-38</sub> = 0.57 beziehen sich auf das CID-3 Kollektiv.

[0167] Fig. 17 zeigt  $A\beta_{1-38}/A\beta_{1-40}$  in Abhängigkeit von  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ . Es besteht ein signifikanter und spezifischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern bei AD. In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgeraden nimmt die Schwere der Demenz zu (vergl. Fig. 18). Über die Grenzwertlinie  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} = 0.14$  werden alle AD-3 Patienten korrekt klassifiziert und kein NDC-3 Patient fälschlich der AD-3 Gruppe zugeordnet. Die Grenzwertlinien

$A\beta_{1-38}/A\beta_{1-40} = 0.26$  und  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} = 0.16$  beziehen sich auf das CID-3 Kollektiv.  
 [0168] Fig. 18 macht deutlich, dass AD-3 Patienten mit einem Quotienten von  $A\beta_{1-38}/A\beta_{1-40}$  von weniger als 0.26 im Mittel eine schwere AD zeigen ( $MMSE \leq 10$ ), sonst dagegen einen mittleren bis leichtgradigen Schweregrad der Demenz aufweisen ( $MMSE > 10$ ).

#### 4.2.3 NDC-2<sup>KP</sup>

[0169] Die im Liquor erniedrigte Konzentration von  $A\beta_{1-42}$  bei Patienten mit AD wurde bisher in zuvor bereits eingefrorenen Proben gefunden. Es wurde daher zunächst an Patienten des Kollektivs NDC-2<sup>KP</sup> untersucht, ob  $A\beta_{1-42}$  im Liquor im Vergleich zu anderen  $A\beta$ -Peptiden besonders empfindlich für Kältepräzipitation ist. In diesem Zusammenhang wurde frisch gewonnener Liquor aliquotiert. Ein Aliquot wurde unbehandelt bei -80° C eingefroren. Mit dem anderen Aliquot wurde der als Trockensubstanz in Eppendorf Probengefäßen vorgelegte SDS-SB aufgenommen. Dieses Aliquot wurde nach SDS-/Hitzenaturierung eingefroren. Mindestens 24 Stunden nach Lagerung bei -80° C erfolgte dann die vergleichende Analyse mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Es wurden zehn neuropsychiatrische Kontrollpatienten ohne Alzheimer-Demenz untersucht. Bei neun dieser Patienten konnten  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  bestimmt werden. Bei einem Patienten konnte lediglich  $A\beta_{1-40}$  ausgewertet werden.

[0170] Tabelle 16a macht deutlich, dass selektiv betont für  $A\beta_{1-42}$  mit hoher interindividueller Varianz kältepräzipitationsbedingt ein Anteil des Peptids verloren geht. Der prozentuale Anteil von  $A\beta_{1-42}$  im nativ eingefrorenen Liquor, der verloren geht, wenn die Kältepräzipitation nicht durch Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung vermindert wird, wurde wie folgt berechnet:

$$\% \Delta A\beta_{1-42} = ((A\beta_{1-42} \text{ nativ})_{\text{conc.}} - [A\beta_{1-42} \text{ SDS}]_{\text{conc.}}) / [A\beta_{1-42} \text{ SDS}]_{\text{conc.}} \times 100.$$

[0171] Ein Wert für  $\% \Delta A\beta_{1-42}$  von "10" bedeutet beispielsweise, dass  $A\beta_{1-42}$  durch Einfrieren von nativem Liquor kältepräzipitationsbedingt um 10% im Vergleich zur "protektiven" Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung reduziert wurde. Da die Proben nicht vor dem Einfrieren gemessen werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Proben durch Kältepräzipitation ein zusätzlicher Anteil von  $A\beta_{1-42}$  verloren geht, der auch durch die Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung nicht verhindert werden kann.

[0172] Tabelle 16b macht deutlich, dass  $A\beta_{1-42}$  nach Einfrieren von nativem Liquor KP-bedingt im Mittel um etwa 30% reduziert wird ( $\Delta A\beta_{1-42}\%: -29.9 \pm 10.9$ , MW  $\pm$  SD;  $p=0.005$ ). Die maximal beobachteten absoluten und prozentualen Abfälle für  $A\beta_{1-42}$  betragen -798.3 pg bzw. -44.5%. Der leichte Abfall von  $A\beta_{1-40}$  ( $\Delta A\beta_{1-40}\%: -3.5 \pm 6.3$ ; MW  $\pm$  SD;  $p=n.s.$ ) ist dagegen nicht signifikant, entsprechend aber das Verhältnis  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  ( $\Delta(A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40})\%: -27.0 \pm 10.2$ ; MW  $\pm$  SD;  $p=0.008$ ).

#### 4.2.4 NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup>

[0173] Anschließend wurde anhand der Patientenkollektive NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup> untersucht, ob sich im Liquor krankheitsspezifische Unterschiede in der Kältepräzipitation von  $A\beta_{1-42}$  zeigen. Die Quantifizierung von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor erfolgte mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera. Die differentielle Probenvorbehandlung erfolgte wie für das Kollektiv NDC-2<sup>KP</sup> ausgeführt.

[0174] Die Konzentrationen für  $A\beta_{1-42}$  in Abhängigkeit der Probenvorbehandlung sind für die beiden Patientenkollektive in Tabelle 21 zusammengefaßt.

[0175] In Fig. 19 ist die Konzentrationen von  $A\beta_{1-42}$  nach Einfrieren von nativem Liquor in Abhängigkeit ( $A\beta_{1-42}$  nativ) von der Kältepräzipitation dargestellt. Durch die Bestimmung von  $A\beta_{1-42}$  im nativ eingefrorenen Liquor können die Patientenkollektive NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup> signifikant getrennt werden ( $p=0.0013$ ). Dennoch besteht nach Fig. 19 eine deutliche Überschneidung der beiden Patientenkollektive. Demnach haben 6/15 Patienten des NDC-3<sup>KP</sup> Kollektivs  $A\beta_{1-42}$  Liquorspiegel unterhalb der Grenzkonzentration (2100 pg/ml) des AD-3<sup>KP</sup> Kollektivs. Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Grenzkonzentration von  $\Delta A\beta_{1-42}\% (-17\% \text{ bis } -20\%)$  wird dagegen nur noch ein NDC-3<sup>KP</sup> Patient fälschlich dem AD-3<sup>KP</sup> Kollektiv zugeordnet. Gleichzeitig werden alle Patienten des AD-3<sup>KP</sup> Kollektivs korrekt zugeordnet.

[0176] Die mittlere kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  beträgt bei NDC-3<sup>KP</sup> -24.6%  $\pm$  16.8 (MW  $\pm$  SD), was gut mit dem oben genannten Daten für die NDC-2<sup>KP</sup> Patienten übereinstimmt (-29.9  $\pm$  10.9, MW  $\pm$  SD). Dabei wird erneut bei den NDC-3<sup>KP</sup> Patienten eine erhebliche interindividuelle Varianz für das Ausmaß der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor deutlich. Dabei wird das Ausmaß der kältepräzipitationsbedingten

Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  bei NDC-3KP Patienten anscheinend wesentlich durch das Vorliegen des ApoE  $\epsilon 4$  Allels bestimmt: Von den 4 Patienten mit der höchsten KP-bedingten Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  ( $\Delta A\beta_{1-42} \% < -40\%$ ) tragen 3 Patienten ein ApoE  $\epsilon 4$  Allel (vergl. Fig. 19)

[0177] AD Patienten zeigen dagegen keine nennenswerte kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  und aus Fig. 19 geht hervor, dass die  $\% \Delta A\beta_{1-42}$  Werte hier um die Null-Achse streuen ( $-1.6 \pm 10.2$ ,  $MW \pm SD$ ). Entsprechend ist der Gruppenvergleich NDC-3KP versus AD-3KP für  $\Delta A\beta_{1-42} \%$  signifikant ( $p=0.0025$ ). Bemerkenswert ist, dass die KP-bedingte Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  bei AD-3KP fehlt, obwohl 9/11 Patienten  $\epsilon 4$ -positiv sind. Bei zwei AD-3KP Patienten ist der ApoE Genotypus nicht bekannt. Weiter fällt auf, dass AD-3KP und NDC-3KP Patienten mit mindestens einem  $\epsilon 4$  Allel etwa gleich tiefe  $A\beta_{1-42}$  Liquorspiegel haben. Dieser Zusammenhang wurde weiter oben auch bei dem Vergleich der  $A\beta_{1-42}$  Liquorspiegel der Kollektive OND-3c4plus und AD-3c4plus deutlich (vergl. 4.2.2.3).

[0178] Gleichzeitig unterscheiden sich diese beiden Patientenuntergruppen besonders deutlich in ihrer KP-bedingten Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$ . Diese ist besonders stark bei den  $\epsilon 4$ -positiven NDC-3KP Patienten und fehlt fast vollständig bei den  $\epsilon 4$ -positiven AD-3KP Patienten. Demnach haben die  $\epsilon 4$ -positiven Patienten aus dem AD-3KP Kollektiv im Gegensatz zu den  $\epsilon 4$ -positiven Patienten aus dem NDC-3KP Kollektiv tiefe Liquorspiegel von  $A\beta_{1-42}$  trotz 'protektiver' SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren. Entsprechend sollten sich die beiden Patientenkollektive AD-3KP und NDC-3KP nach Vorbehandlung mit SDS-/Hitzedenaturierung über die Bestimmung von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor ( $A\beta_{1-42}SDS$ ) wesentlich besser differenzieren lassen. Fig. 20 bestätigt diese Annahme:

Die KP-bedingte Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  wird um den Anteil vermindert, der durch die 'protektive' SDS-/Hitzedenaturierung verhindert werden kann, wodurch die NDC-3KP Patienten jetzt im Mittel deutlich höhere  $A\beta_{1-42}$  Liquorspiegel ( $A\beta_{1-42}SDS$ ) haben. Die  $A\beta_{1-42}$  Liquorspiegel bei AD-3KP bleiben dagegen weitgehend unverändert tief.

[0179] Entsprechend verbessert sich das Signifikanzniveau des Gruppenvergleichs NDC-3KP versus AD-3KP bei Differenzierung der Kollektive über  $A\beta_{1-42}SDS$  deutlich ( $p=1.81 \times 10^{-6}$ ). Alle NDC Patienten (15/15) und nur ein AD Patient (1/11) liegen jetzt oberhalb der Grenzkonzentration von  $A\beta_{1-42}SDS = 2100$  pg/ml.

[0180] Wie oben ausgeführt, ist dieser Effekt bei den Trägern von  $\epsilon 4$  Allelen innerhalb des NDC-3KP Kollektivs besonders stark ausgeprägt. Fig. 19 und 20 machen aber deutlich, dass dieser Effekt nicht ausschließlich über das Vorliegen des  $\epsilon 4$  Allels bestimmt wird. Einzelne Patienten mit beispielsweise dem ApoE Genotypus 3/3 zeigen gleichfalls eine ausgeprägte KP-bedingte Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$ , die durch SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren vermindert werden kann. Zusammenfassend lassen sich folgende  $A\beta$ -Peptidgrenzwerte angeben:

$A\beta_{1-42}nativ = 2100$  pg/ml &  $\% \Delta A\beta_{1-42} = -17\%$ : Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und ein NDC-Patient (1/15) wird falsch klassifiziert.

$A\beta_{1-42}nativ = 2300$  pg/ml &  $\% \Delta A\beta_{1-42} = -20\%$ : Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und zwei NDC-Patienten (2/15) werden falsch klassifiziert.

Und  
 $A\beta_{1-42}SDS = 2100$  pg/ml &  $\% \Delta A\beta_{1-42} = -17\%$ : 10/11 AD-3KP Patienten werden richtig und kein NDC-3KP Patient (0/15) wird falsch klassifiziert.

$A\beta_{1-42}SDS = 2300$  pg/ml &  $\% \Delta A\beta_{1-42} = -20\%$ : Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und zwei NDC-Patienten (2/15) werden falsch klassifiziert.

[0181] Die Bestimmung von  $\% \Delta A\beta_{1-42}$  zusätzlich zu  $A\beta_{1-42}SDS$  wird voraussichtlich die neurochemische AD-Diagnostik weiter verbessern:

Bei einem  $A\beta_{1-42}SDS$  Grenzwert von 2300 pg/ml statt 2100 pg/ml werden drei NDC Patienten (3/15) falsch und alle AD Patienten korrekt klassifiziert. Wird zusätzlich der Grenzwert  $\% \Delta A\beta_{1-42} = -20\%$  berücksichtigt, werden nur zwei NDC Patienten (2/15) falsch und alle AD

Patienten korrekt klassifiziert. Damit kann die  $A\beta_{1-42}SDS$  Schwellenkonzentration um 200 pg/ml steigen, ohne dass sich gleichzeitig die diagnostische Spezifität verringert.

[0182] Zusammenfassend können aus den oben genannten Befunden zur KP-bedingten Erniedrigung von  $A\beta$ -Peptiden folgende Hypothesen abgeleitet werden:

$A\beta_{1-42}$  liegt im humanen Liquor im Vergleich zu  $A\beta_{1-40}$  vermehrt in einer Fraktion vor, die KP-abhängig reduziert werden kann. Durch Einsatz von Detergentien kann  $A\beta_{1-42}$  zumindest partiell aus dieser Fraktion freigesetzt werden und die KP-bedingte Erniedrigung reduziert werden. Bei dieser  $A\beta_{1-42}$  bindenden Fraktion handelt es sich wahrscheinlich um vergleichsweise hydrophobe höhermolekulare Komplexe unter Beteiligung von  $A\beta_{1-42}$  und wahrscheinlich anderer Proteine (z.B. Lipoproteine).

(Anmerkung: Durch Analyse von Fraktionen aus der Gelfiltration (SEC-FPLC) von humanem Liquor mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot konnte gezeigt werden, dass selektiv betont für  $A\beta_{1-42}$  ein beträchtlicher Anteil in einer hochmolekularen Fraktion transportiert wird).

[0183] Bei AD - im Gegensatz zu NDC - läßt sich  $A\beta_{1-42}$  auch durch starke Detergentien kaum aus dieser Fraktion verdrängen, was auf eine AD-spezifische Zusammensetzung dieses Komplexes hinweist. In diesem Fall wäre zu er-

warten, dass  $A\beta_{1-42}$  im Liquor bei AD auch dann spezifisch erniedrigt wäre, wenn die Proben nach Detergentienbehandlung direkt gemessen würden, d.h. ohne vorheriges Einfrieren. Damit könnten die Proben nach Detergentienbehandlung bei Raumtemperatur in Anwesenheit von SDS und Proteaseinhibitoren (3.1.3.1b, SDS-SB-3) bis zur Messung gelagert werden, da diese sehr effektiv vor Autoaggregation, Präzipitation, unpezifischer Proteaseaktivität und Keimbildung geschützt wären.

[0184] Alternativ kann angenommen werden, dass die Erniedrigung von  $A\beta_{1-42}$  bei AD im wesentlichen dadurch bedingt ist, dass der Liquor bei AD insgesamt weniger  $A\beta_{1-42}$  enthält.

[0185] Bei hochaffiner detergentien-stabiler Bindung von  $A\beta_{1-42}$  an einen Komplex wird das Peptid in dieser Bindung vermehrt dem enzymatischen Katabolismus entzogen. Damit stellt dieser Komplexes auch ein Target für die Entwicklung von Medikamenten gegen die Alzheimer-Demenz dar, da Substanzen die mit der Bindung von  $A\beta$ -Peptiden an diesen Komplex konkurrieren,  $A\beta$ -Peptide vermehrt dem enzymatischen Katabolismus zuführen könnten. Die Reduktion von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor bei einem Teil der Patienten mit Creutzfeldt-Jakob-Demenz, einer weiteren Amyloidoide oder Proteinfaltungskrankheit des ZNS, legt nahe, dass dieser Komplex bei beiden Erkrankungen ein vergleichbare Zusammensetzung aufweisen könnte.

[0186] Die oben genannten Befunde sind auch für die Frühdiagnostik oder präklinische Diagnostik der AD relevant. Hier stellt sich die Frage, ob Patienten, die trotz "protektiver" \*SDS-Hitzedenaturierung ( $A\beta_{1-42}$ SDS) tiefe  $A\beta_{1-42}$  Li-quorspiegel zeigen und gleichzeitig durch eine geringe KP-bedingte Abnahme von  $A\beta_{1-42}$  ( $\Delta A\beta_{1-42}$ ) auffallen, ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung einer AD tragen. Diese Fragestellung könnte durch eine prospektive Untersuchung bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen (ICD10 F06.7) beantwortet werden, da diese Patienten in bis zu 30% der Fälle innerhalb von zwei Jahren eine AD entwickeln. Hier wäre eine einmalige Liquorpunktion mit anschließender Verlaufsbeurteilung (Klinik, Neuropsychologie, Bildgebung) ausreichend, da der prädiktive Wert der Parameter retrospektiv bestimmt werden könnte.

[0187] Damit liegt nahe, prinzipiell bei jedem Patienten ein A- (nativ eingefroren) und B-Aliquot (SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren) der Liquorprobe zu gewinnen. Gegebenenfalls reicht es aus, die Proben unter Kontrolle der Temperatur der individuellen Probe standardisiert auf beispielsweise 0° C abzukühlen.

[0188] Allgemein wird man die oben dargestellte differentielle Probenvorbereitung auch mit ELISA-Methoden oder Einsatz der Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) für die Bestimmung von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor kombinieren können.

[0189] Die Nachweisempfindlichkeit des ELISA der Firma BioSource für die Bestimmung von  $A\beta_{1-42}$  im humanen Liquor liegt beispielsweise bei 10 pg/ml. Diese Nachweisempfindlichkeit erlaubt bei Auftrag von 100  $\mu$ l Probe, den SDS-/Hitzedenaturierten Liquor vor der Messung mindestens fönfach zu verdünnen. Die resultierende Konzentration von 0.1% SDS (w/w) beeinträchtigt nach eigenen Ergebnissen nicht die in diesem ELISA im ersten Schritt verwendeten N-terminalen Fangantikörper. Analog kann dies auch für die innerhalb der RIPA-IP eingesetzten N-terminal selektiven Antikörper 1E8 und 6E10 belegt werden.

[0190] Bei der FCS mit Kreuzkorrelation unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten N-terminal und C-terminal selektiven Antikörpern ist die Signalintensität proportional der innerhalb solcher Aggregate gebundenen  $A\beta$ -Peptide. Die Sensitivität der Methodik erlaubt auch hier eine Verdünnung der Probe nach SDS-/Hitzedenaturierung auf SDS-Konzentrationen von beispielsweise 0.1% w/v. Sollte  $A\beta_{1-42}$  selektiv bei AD detergentien-stabil an höhermolekulare Aggregate gebunden vorliegen wird durch Vorbehandlung der Liquorproben mit Detergentien die Spezifität der Messung erhöht, da die  $A\beta$ -Peptide bei den NDC Patienten im Gegensatz zu den AD Patienten aus den höhermolekularen Aggregaten freigesetzt werden. Die verminderte Reduktion des Fluoreszenzsignals der FCS (Kreuzkorrelation) nach Detergentienbehandlung bei Patienten mit AD im Vergleich zu Patienten mit NDC könnte damit für die neurochemische AD Diagnostik relevant werden.

#### 4.2.5 Hirnhomogenate von Patienten mit AD, frontotemporaler Demenz, Lewy-Körperchen-Demenz und Kontrollen

[0191] Hirngewebe (frontotemporaler Cortex, Cerebellum) von Patienten mit AD, frontotemporaler Demenz (FTD), Lewy-Körperchen-Demenz (LBD) und nicht-dementen Kontrollen wurde in Anwesenheit von RIPA Detergentienpuffer homogenisiert (3.4.6). Anschließend wurde eine Immunopräzipitation in Anwesenheit von RIPA durchgeführt. In der RIPA-Detergenz extrahierbaren Fraktion der  $A\beta$ -Peptide ließen sich  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{2-42}$  nachweisen (Fig. 21a,b).  $A\beta_{2-42}$  wurde durch MALDI-TOF Analyse direkt von der Blotmembran (Daten nicht gezeigt),  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 (Fig. 23b) und  $A\beta$ -IPG-2D-PAGE/ Immunoblot-2 (Fig. 24c) identifiziert.  $A\beta_{2-42}$  wird auch in Liquorproben bei AD (Fig. 23a) und in Zellkulturüberständen nachgewiesen (Fig. 23a, Fig. 28a,b).

[0192] Patienten mit AD waren im Vergleich zu nicht-dementen Kontrollen und Patienten mit FTD durch eine massiven Anstieg von  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{2-42}$  gekennzeichnet. Dieser Anstieg war im frontotemporalen Cortex weitaus ausgeprägter als im Zerebellum (Fig. 22). Patienten mit LBD zeigten Anstiege von  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{2-42}$  in Abhängigkeit der Anzahl zusätzlich vorliegender Alzheimer-typischer  $\beta$ -Amyloidplaques, die über die CERAD Klassifikation erfasst wer-

den (Fig. 21b): Patienten mit LBD CERAD A hatten deutlich weniger  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{2-42}$  als Patienten mit LBD CERAD C. [1913] Bei Alzheimer-Demenz fielen vergleichsweise hohe Konzentrationen von  $A\beta_{1-38}$  auf (Fig. 21a,b). Gleichzeitig war eine gewebspezifische Expression von  $A\beta_{1-38}$  bei AD auffällig, da im Zerebellum relativ zum frontotemporalen Kortex  $A\beta_{1-38}$  deutlich geringer war oder nicht nachweisbar war und zusätzlich bei einigen Patienten eine bisher nicht charakterisierte Bande unterhalb von  $A\beta_{1-38}$  meßbar wurde (Fig. 22). Da der carboxyterminale Schnitt durch  $\gamma$ -Sekretase(n) erfolgt, ergibt sich damit ein Hinweis auf eine ggf. gewebspezifisch unterschiedliche Expression von  $\gamma$ -Sekretase(n). Da sich im Zerebellum im Vergleich zu anderen Hirnregionen bei AD bekanntlich wenig Alzheimer-typische neuropathologische Veränderungen zeigen, könnte dieser Befund und pathophysiologisch relevant sein.

[1914] Die extrem hohen Konzentrationen von  $A\beta_{2-42}$ , zum Teil in Höhe von  $A\beta_{1-42}$ , in einer RIPA-etrahierbaren Hirnpräparation wurde bisher nicht beschrieben. Bei einigen Patienten war zusätzlich  $A\beta_{1-40}$  vergleichsweise stark erhöht.

Damit kann der  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot für die neuropathologische Differentialdiagnostik dementieller Erkrankungen eingesetzt werden und ggf. über eine biochemische Phänotypisierung zur Differenzierung von Subgruppen der sporadischen AD beitragen.

#### 4.3 Cisternaler Liquor von Kaninchen und Meerschweinchen.

[1915] Auch im cisternalen Liquor des adulten Meerschweinchens (Fig. 25a) und Kaninchens (Fig. 25b) sind  $A\beta_{1-37/38/39}$  neben  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  nachweisbar. Die Varianz der Meßwerte wird deutlich reduziert, wenn analog zu den Patientenproben vor dem Einfrieren der Proben die SDS-/Hitzedenaturierung durchgeführt wird. Diese Probenvorbehandlung ist für Wirkstofffindungsprojekte unter Einsatz von Meerschweinchen oder Kaninchen als Tiermodell relevant, da bestimmte Substanzeffekte (z.B. Sekretaseinhibition) auf diese Weise schon mit deutlich weniger Tieren pro Behandlungs- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden können.

#### 4.4 Hippokampale Gewebeschnitte des adulten Meerschweinchens mit Kurzzeilkultur

[1916] In Kurzzeilkulturen hippokampaler Gewebeschnitte des adulten Meerschweinchens werden  $A\beta_{1-37/38/39}$  neben  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  in den Überstand sezerniert und sind auch intrazellulär nachweisbar (Fig. 26).

#### 4.5 Zellkultur

##### 4.5.1 Primäre telencephale Hühnchenkultur

[1917] Da die  $A\beta$ -Peptid Aminosäuresequenz des Hühnchens und die humane Sequenz übereinstimmen, wurde ein primär neuronales Zellkultursystem aus den Vorderhinbläschen von Hühnerembryonen etabliert (vergl. 3.7). Dabei ergab sich, dass neben  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  die C-terminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37/38/39 in die Zellkulturüberstände freigesetzt werden, und die relative Verteilung der  $A\beta$ -Peptide gut mit der im humanen Liquor übereinstimmt.

##### 4.5.2 Transgene APP751<sub>SW</sub> Neurogloma Zelllinie

[1918] Vergleichend wurde das  $A\beta$ -Peptidmuster in Neuroglioma-Zellen (H4) untersucht, die mit humanAPP751<sub>SW</sub> translatiert wurden. Fig. 28a&b zeigt, dass auch hier neben  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$ , die C-terminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37/38/39 in die Zellkulturüberstände freigesetzt werden. Zusätzlich kann  $A\beta_{2-42}$  identifiziert werden. Nach Behandlung mit Inhibitoren der  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretasen (Calpain-Inhibitor I&II, Calpeptin, MG132, Leupeptin) werden neben  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  auch die C-terminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37/38/39 und das N-terminal verkürzte  $A\beta_{2-42}$  reduziert (Fig. 28a,b). Fig. 28b zeigt die dosisabhängige Reduktion unter Calpaininhibitor-1.

[1919] Entsprechend kann angenommen werden, dass die  $A\beta$ -Peptide 1-37/38/39, wie für 1-40/42 bekannt, auch durch den kombinierten  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretaseschnitt entstehen. Die Reduktion von 2-42 kann durch Hemmung von  $\beta$ - $\gamma$ -Sekretaseaktivität bedingt sein, oder durch vermindertes Substratangebot ( $A\beta_{1-42}$ ) für eine nachgeschaltete N-terminale Aminopeptidase (siehe aber unten).

[0200] Aus Fig. 29a&b geht hervor, dass die C-terminal verkürzten  $A\beta$ -Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 mit einer anderen Kinetik gehemmt werden als  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$ . Der Unterschied in der Kinetik ist besonders ausgeprägt für  $A\beta_{1-37}$ . Dieser Befund zeigt an, dass über das  $A\beta$ -Peptidmuster eine Heterogenität der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität abgebildet werden kann, was für die Wirkstofffindung selektiver  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren relevant ist. Weiter ist bemerkenswert, dass der aus der Literatur bekannte paradoxe Anstieg von  $A\beta_{1-42}$  bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen nicht mit einem Anstieg von  $A\beta_{2-42}$  korreliert ist. Dies spricht gegen eine sekundäre Entstehung von  $A\beta_{2-42}$  aus  $A\beta_{1-42}$ .

[0201] Für die Entstehung von  $A\beta_{1-37}$  muß eine weitere Alternative berücksichtigt werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Neutrale Endopeptidase (NEP) durch den kombinierten Schnitt 10/11 und 37/38 am Katabolismus von

A $\beta$ -Peptiden wesentlich beteiligt ist (Iwata et al., 2000). Damit könnte A $\beta$ <sub>1-37</sub> auch durch die Kombination BACE-Schnitt und NEP-Schnitt 37/38 entstehen.

#### Liste der Abkürzungen :

[0202]

A $\beta$	- $\beta$ -Amyloid
AD	- Alzheimer Demenz
APP	- Amyloidvorläuferprotein
FAD	- familiäre AD, d.h. genetisch bedingt
PS-1	- Presenilin 1
PS-2	- Presenilin 2
Bis	- N, N'-Methylenbisacrylamide
Bicin	- N,N'-bis-[2-Hydroxyethyl]-Glycin
%T	- Gesamtacrylamid Monomer Konzentration (w/v)
%C	- Anteil von Bis an der Gesamtmenge des Acrylamid Monomers (w/w)
A $\beta$ -SDS-PAGE	- $\beta$ -Amyloid Natrium Laurylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
A $\beta$ -2D-PAGE	- $\beta$ -Amyloid-zweidimensionale-Polyacrylamidgelelektrophorese
IPG	- immobilisierter pH Gradient
A $\beta$ 1-n	- A $\beta$ <sub>1-n</sub>

#### 5. Literatur

[0203]

Görg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A. and Weiss W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-86.

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Csordas A., Diaz J.J. and Madjar J.J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* **18**, 328-37.

Heukeshoven J. and Demick R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.

Hulstaert F., Biennow K., Ivanoliu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang J., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vanmechelen E. and Vanderstichele H. (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* **52**, 1555-62.

Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schroder J., Zerfass R., Forst H., Sandbrink R., Masters C.L. and Beyreuther K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* **271**, 22908-14.

Klaffki H., Abramowski D., Swoboda R., Paganetti P.A. and Staufenbiel M. (1996) The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem* **271**, 28655-9.

Klaffki H.W., Wiltfang J. and Staufenbiel M. (1996) Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal Biochem* **237**, 24-9.

Kuo Y.M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J. and Roher A.E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3- pyroglutaminyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 188-91.

Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D. and Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-44.

Metz C.E. (1978) Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* **8**, 283-98.

O'Farrell P., Goodman H. and O'Farrell P. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-41.

O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21.

Righetti P.G. and Bossi A. (1997) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Anal Biochem* **247**, 1-10.

Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P. and Teller J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* **409**, 411-6.

Schagger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.

Tamacka A., Sawamura N., Fukushima T., Shoji S., Matsubara E., Shoji M., Hirai S., Furiya Y., Endoh R. and Mori H. (1997) Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **148**, 41-5.

Thome J., Kornhuber J., Munch G., Schinzel R., Taneli Y., Zielke B., Rosler M. and Riederer P. (1996) [New hypothesis on etiopathogenesis of Alzheimer syndrome. Advanced glycation end products (AGEs)]. *Nervenarzt* **67**, 924-9.

Thome J. M.G., Schinzel R., Kornhuber J., Blum-Degen D., Sitzmann L., Rösler M., Heidland A., Riederer P. (1996) Advanced glycation endproducts- associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci* **59**, 679-685.

Wittfang J., Arold N. and Neuhoff V. (1991) A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* **12**, 352-66.

Wittfang J., Smirnov A., Schnierstein B., Kelemen G., Matthies U., Klafki H.W., Staufienbiel M., Huther G., Ruth E. and Kornhuber J. (1997) Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* **18**, 527-32.

Wittfang J., Otto M., Ruther E., Kornhuber J. (1998) Klinisch-chemische Früh- und Differentialdiagnostik der Alzheimer Demenz. *psycho* **24**, 726-31.

Wittfang J., Esselmann H., Smirnov A., Maler M.J., Bleich S., Otto M., Bibl M., Ruther E., Kornhuber J. (2000) Therapieansätze in der Alzheimer-Demenz. *Notfallmedizin* **26**, 246-51.

Tabelle 1: Stammlösungen und Puffer für die Aß-SDS-PAGE

Lösung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1.6 M Tris, 0.4 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Sammelgelpuffer	0.8 M Bistris, 0.2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Kammgelpuffer	0.72 M Bistris, 0.32 M Bicin
Kathodenpuffer	0.2 M Bicin, 0.1 M NaOH, 0.25 % w/v SDS
Anodenpuffer	0.2 M Tris, 0.05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1%ige SDS	1% (w/v) SDS
10%ige SDS	10% (w/v) SDS
Acrylamid/Bis 60 %T / 3 %C <sup>1</sup>	58.2 % (w/v) Acrylamid, 1.8 % (w/v) Bis
Acrylamid/Bis 60 %T / 5 %C <sup>1</sup>	57% (w/v) Acrylamid, 3% (w/v) Bis

<sup>1</sup> Die Acrylamid Stammlösung wird für 30 min mit AG 501-X8D Mischbettionenaustauscher Matrix (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) gerührt, gefiltert, und bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Table 2: Zusammensetzung von Kamm-, Sammel-, und Trenngel für die Aß-SDS-PAGE

Lösung	Kammgel 9%T / 5%C	Sammelgel 8%T / 5%C	Trenngel 12%T / 5%C / 8M Harnstoff
Kammgelpuffer	2000 µl		
Sammelgelpuffer		2000 µl	
Trenngelpuffer			2500 µl
Acrylamid/Bis (60 %T / 3 %C)	400 µl	400 µl	
Acrylamid/Bis (60 %T / 5 %C)			2000 µl
Harnstoff			4,80 g
1% (w/v) SDS	1000 µl	1000 µl	
10% (w/v) SDS			250 µl
H <sub>2</sub> O	600 µl	600 µl	ad 10 ml (ca. 1.51 ml)
10% AMPS	24 µl	24 µl	40 µl
TEMED	8 µl	8 µl	5 µl
Bromphenol Blau, 1% (w/v)	15 µl		

Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer für die Probenaufnahme (SDS-SB)

Reagenz	SDS-SB-1*	SDS-SB-2*	SDS-SB-3*
Bistris	0,36 M	0,72 M	0,120 M
Bicine	0,16 M	0,32 M	0,063 M
Saccharose	15,0% (w/v)	30,0 % (w/v)	5,0% (w/v)
SDS	1,0% (w/v)	2,0% (w/v)	0,5% (w/v)
Bromphenol Blau	0,004% (w/v)	0,008% (w/v)	0,002% (w/v)
Proteinase inhibitor cocktail tablets			1 Tabl. / 10 ml

\* direkt vor Aß-SDS-PAGE mit 2,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol 5 min bei 95°C aufkochen

Tabelle 4a: Zusammensetzung des IEF-SB

Reagenz	IEF-SB
Harnstoff	8 M
CHAPS	0,27% (w/v)
NP-40	0,13% (v/v)
Servalyt pH 3-10 (40%ig)	1% (v/v)
Servalyt pH 4-7 oder pH 5-6	1% (v/v)
2-Mercaptoethanol	5% (v/v)

Tabelle 4b: Zusammensetzung des Trägerampholyt-IEF-Rundgels

Lösung	Volumen	IEF-Rundgel
Acrylamid/Bis (60%T / 3%C)	89 µl	5,4%T / 3%C
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	280 µl	
Harnstoff	480 mg	8 M
2% (w/v) CHAPS	135 µl	0,27%
2% (w/v) NP-40	65 µl	0,13%
Servalyt pH 3-10 (40%ig)	25 µl	1%
Servalyt pH 5-6 oder 4-7	25 µl	1%
1% (w/v) AMPS	20 µl	
10% (v/v) TEMED	10 µl	

Tabelle 4c: Zusammensetzung von Anolyte und Katholyte für die Trägerampholyt-IEF

Lösung	Zusammensetzung
Katholyt	20 mM NaOH
Anolyt	10 mM $H_3PO_4$

Tabelle 4d: Zusammensetzung des IEF-Equilibrationpuffers und der IEF-Agaroselösung

Reagenz	IEF-Equilibrationpuffer	IEF-Agaroselösung
Bicin	0,16 M	0,16 M
Bis	0,36 M	0,36 M
SDS	1% (w/v)	1% (w/v)
Bromphenol Blau		0,004% (w/v)

Tabelle 5a: Zusammensetzung von IPG-SB (Lysispuffer) und IPG-Rehydrationslösung

Reagenz	IPG-SB (Lysispuffer)	IPG-Rehydrationslösung
Harnstoff	9,0 M	8,0 M
Serolol MB-1	1,0% (w/v)	1,0% (w/v)
CHAPS	2,0% (w/v)	0,5% (w/v)
DTT	1,0% (w/v)	0,2% (w/v)
Pharmalyte pH 3-10 (40%)	0,8% (v/v)	0,8 (v/v)

Tabelle 5b: Zusammensetzung der IPG-Equilibrationpuffers

Reagenz	IPG-Equilibrationpuffer
Harnstoff	6,0 M
Glycerol (100%)	20,0% (w/v)
SDS	2,0% (w/v)
Bis	0,36 M
Bicin	0,16 M

1. 10 min in IPG-Equilibrationpuffer mit 1% (w/v) DTT bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren

2. 10 min in IPG-Equilibrationpuffer mit 4,8% (w/v) Iodoacetamid bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren

Tabelle 5c: Zusammensetzung der IPG-Agaroselösung

Reagenz	IPG-Agaroselösung
Agarose	1,0% (w/v)
SDS	0,25% (w/v)
Bromphenol Blau	0,002% (w/v)
Bis-tris	0,36 M
Bicin	0,16 M

Tabelle 6: Zusammensetzung der RIPA-Puffer

Reagenz	*RIPA <sub>1x</sub>	*RIPA <sub>0,5x</sub>
HEPES/NaOH pH 7,4	50 mM	50 mM
NP40	1,0% (v/v)	0,5% (v/v)
Na-Deoxycholat	0,5% (w/v)	0,25% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)	0,05% (w/v)
NaCl	150 mM (w/v)	150 mM (w/v)

\*Zusatz: 1 Tablette Protease Inhibitor Mix pro 10 ml RIPA<sub>0,5x</sub> bzw. RIPA<sub>1x</sub>-Puffer

Table 7: Silberfärbung nach Glutardialdehydfixierung

Lösungen	Zeit (min)
kaltes (4°C) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	3 x 10
30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) Hac <sup>1</sup>	1 x 60
30% (v/v) EtOH, 0,5 M Natriumazetat, 0,5% (v/v) Glutardialdehyd, 0,2% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 x 60
kaltes (4°C) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	3 x 15
0,1% (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,02% (v/v) Formaldehyd	1 x 60
2,5% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,02% (v/v) Formaldehyd	5-10
0,05 M (w/v) Glycin	30

<sup>1</sup> Gele nach Glutardialdehydfixierung (Wiltfang et al., 1997, Electrophoresis 18: 527-32) können in dieser Lösung bei 4°C gelagert werden, wenn die Silberfärbung später durchgeführt werden soll. Die hier untersuchten  $\alpha\beta$ -Peptide und Proteine können auch direkt in EtOH/Hac fixiert werden.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Biotpuffer für den Western-Immunoblot

Reagenz	Biotpuffer A	Biotpuffer B	Biotpuffer C
Tris	0,21 M	25 mM	25 mM
Methanol	30% (v/v)	30% (v/v)	
SDS			0,025% (w/v)
pH	10,4	10,4	9,0*

\* mit 0,5 M Borsaure eingestellt

Tabelle 9a: Stammlösungen für den Immunoblot

Lösung	Zusammensetzung
PBS <sub>10</sub> (10x konz.)	95,5 g Phosphat-gepuffertes NaCl auf 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PBS-T (0,075% v/v Tween-20 in PBS)	75 ml Tween-20 ad 1000 ml PBS <sub>10</sub>
PBS-T-M	2,5 g Milchpulver ad 100 ml PBS-T

Tabelle 9b: Puffer, Lösungen und Antikörper für Western-Immunoblot-1 und -2

Immunoblot-Schritt	Zeit	Western-Immunoblot-1	Western-Immunoblot-2
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	1 h	2,5% (w/v) Milchpulver in PBS-T	10% (v/v) Rot-Block in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Inkubation mit primärem mAb bei 4°C über Nacht	15 h	a) mAb 1E8, 1:4000 in Milchpulver-PBS-T; mAb 6E10, 1:1000 in Milchpulver-PBS-T	a) mAb 1E8, 1:4000 in 10% (v/v) Rot-Block / H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Waschschritt	3x10 min	PBS-T	PBS-T
Inkubation mit sekundärem Ab bei Raumtemperatur	1 h	biotinylierter anti-Maus-Antikörper, 1:3000 in Milchpulver-PBS-T	biotinylierter anti-Maus-Antikörper, 1:3000 in PBS-T
Waschschritt	3x10 min	PBS-T	PBS-T
Inkubation mit Streptavidin-POD bei Raumtemperatur	1 h	Streptavidin-POD-Komplex, 1:3000 in PBS-T	Streptavidin-POD-Komplex, 1:3000 in PBS-T
Waschschritt	3x10 min	PBS-T	PBS-T

Tabelle 10a-d:

Zusammenstellung der Kollektive mit Schnittmengen gemeinsamer Patienten. NDC-3 <sup>KP</sup> ist vollständig Teilkollektiv von NDC-3. AD-3 <sup>KP</sup> ist weitgehend Teilkollektiv von AD-3	
Tabelle 5a)	NDC1 (n=30)
NDC-2 <sup>KP</sup> (n=10)	Schnittmenge (n=2): NP55, NP57
Tabelle 5b)	NDC-3 (n=47)
NDC-3 <sup>KP</sup> (n=15; Teilmenge von NDC-3)	Schnittmenge (n=15): NP213, NP344, NP345, NP352, NP355, NP356, NP364, NP374, NP402, NP412, NP419, NP421, NP457, NP490, NP 526
Tabelle 5c)	AD-1 (n=35)
AD-3 (n=12)	Schnittmenge (n=3): NP37, NP52, NP66
AD-3 <sup>KP</sup> (n=11)	Schnittmenge (n=3): NP52, NP66, NP69
Tabelle 5d)	AD-3 (n=12)
AD-3 <sup>KP</sup> (n=11; Schnittmenge plus NP69/NP197)	Schnittmenge (n=9): NP45, NP52, NP58, NP66, NP111, NP143, NP190, NP319, NP320

**Tabelle 11:** A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-1 von synthetischen A $\beta$ -Peptiden nach direkter Aufnahme der Proben in SDS-PAGE-Probenpuffer und ECL-Detektion mittels Filmbelichtung: Inter- und Intraassayvariationskoeffizienten

A $\beta$ -Peptide	Interassay-VK*	Intraassay-VK*
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (100 pg)	8,5	4,8
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (75 pg)	8,7	6,1
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (50 pg)	10,8	5
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (20 pg)	15,4	8,8
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (25 pg)	10,9	11,1
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (15 pg)	11,7	16,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (10 pg)	19,6	16,4
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (5 pg)	15,1	22,4
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (25pg/100pg)	6,9	7,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (15pg/75pg)	11	12,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (10pg/50pg)	15,6	14,3
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (5pg/25pg)	16,7	19,1

\* VK: Variationskoeffizient (MW/SDx100; %);  
Ausreißer wurden nicht eliminiert.

Tabelle 12: A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-I von A $\beta$ -Peptiden im humanen Liquor bei NDC-I und AD-I

Diagnose	P-CODE	D-CODE	Alter	gesch.	A $\beta$ -40 (ng/ml)	A $\beta$ -42 (pg/ml)	A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 (pg/ng)	A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 (pg/ng)	A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 (pg/ng)
Tourette-Morcher epileptischer Anfall	NP6	NDC	49	weib.	10,24	1916,3	499,6	0,2886	0,4807
Tourette-Morcher epileptischer Anfall	NP7	NDC	77	weib.	12,87	1203,3	266,3	0,1883	0,206
Tourette-Morcher epileptischer Anfall	NP9	NDC	71	weib.	14,71	2744,2	615,7	0,3408	0,5239
Entzünd. ZNS-Prozess, unkl. Genese	NP10	NDC	72	weib.	13,21	2054,3	346,7	0,2959	0,42
Meningitis	NP15	NDC	79	weib.	13,61	2679,2	504,2	0,2967	0,4065
Zerebrale Ischämie	NP13	NDC	69	weib.	14,36	1970,4	312,6	0,1506	0,2365
Neuropathie unkl. Genese	NP17	NDC	81	weib.	6,61	2009,2	669,8	0,2589	0,4919
Depression	NP21	NDC	59	weib.	11	3217,5	738,3	0,4184	0,7187
Chlamydien-assoziierte Vesikulitis	NP22	NDC	69	weib.	6,61	1962,9	350,2	0,2735	0,5004
Depression mit psychotischen Wahnvorstellungen	NP15	NDC	67	weib.	6,61	1842,2	340,1	0,2903	0,5099
Entzünd. ZNS-Prozess, unkl. Genese	T17	NDC	37	weib.	3,38	802,6	102,3	0,1023	0,2578
Alkohol-organische Psychose	T27	NDC	42	weib.	2,93	1237,1	1,109	0,3376	
Katatone Schizophrenie	T28	NDC	42	weib.	2,35	879,2	1,041	0,1041	0,3071
vesikuläre Demenz	T29	NDC	62	weib.	6,32	2551,3	0,2358	0,4547	
Zerebrale Ischämie	T35, NP18	NDC	59	weib.	7,23	3303,9	0,2446	0,4824	
Katatone Syndrom	T40, NP13	NDC	59	weib.	3,19	1356,3	1,027	0,3424	
Paraneuron-Demenz-Komplex	A19	NDC	78	weib.	10,36	734,2	230,4	0,0881	0,1448
Paraneuron-Demenz-Komplex	A185	NDC	74	weib.	5,5	1007,1	375,6	0,2123	0,4824
Pseudodemenz bei Depression	A209	NDC	39	weib.	6,01	1475,8	819,5	0,2501	0,4527
Demenz bei subkortikaler Enzephalopathie	A308	NDC	69	weib.	7,49	689,6	222,5	0,078	0,1949
Paraneuron-Demenz-Komplex	A340	NDC	79	weib.	10,32	1945,4	367	0,1806	0,2733
Paraneuron-Demenz-Komplex	A388	NDC	67	weib.	6,38	967,9	384,3	0,1114	0,209
Pseudodemenz bei Depression	A456	NDC	67	weib.	4,9	1329,9	382,1	0,1426	0,3644
Paraneuron-Demenz-Komplex	A473	NDC	44	weib.	5,8	1980,9	431	0,1833	0,4978
Paraneuron-Demenz-Komplex	A484	NDC	77	weib.	5,1	1952,9	515,9	0,1819	0,4699
Paraneuron-Demenz-Komplex	A562	NDC	77	weib.	10,79	2918,3	490	0,3774	0,9543
vesikuläre Demenz	T5	NDC	67	weib.	5,09	1040,6	0,1331		
vesikuläre Demenz	T13	NDC	73	weib.	4,85	546,7	0,0697	0,1237	
Demenz bei Pick-Krankheit	T23	NDC	53	weib.	2,55	1084,2	0,1172	0,3801	
vesikuläre Demenz	T24	NDC	61	weib.	4,44	1248,8	0,1095	0,2598	
Alzheimer-Demenz	A72	AD	60	weib.	2,99	620	120,3	0,1301	0,4099
Alzheimer-Demenz	A130	AD	75	weib.	6,02	617,7	131,4	0,0627	0,1799
Alzheimer-Demenz	A139	AD	55	weib.	6,99	686,7	206,3	0,1204	0,2879
Alzheimer-Demenz	A193	AD	71	weib.	2,84	274,8	339,2	0,0427	0,2047
Alzheimer-Demenz	A257	AD	67	weib.	6,99	815,4	298,6	0,2965	0,1533
Alzheimer-Demenz	A278	AD	58	weib.	9,42	1989,8	363,5	0,1899	0,3991
Alzheimer-Demenz	A291	AD	81	weib.	3,55	411,8	636,5	0,047	0,2108
Alzheimer-Demenz	A391	AD	76	weib.	6,95	654,6	589,1	0,0512	0,1828
Alzheimer-Demenz	A494	AD	56	weib.	11,87	706,3	297,8	0,123	0,2307
Alzheimer-Demenz	A477	AD	65	weib.	27,94	1357,9	373	0,1784	0,3132
Alzheimer-Demenz	T1	AD	70	weib.	5,21	536,7	0,0628	0,1145	
Alzheimer-Demenz	T2	AD	70	weib.	5,99	1199,8	0,0868	0,182	
Alzheimer-Demenz	T3	AD	72	weib.	4,63	440	0,0539	0,1542	
Alzheimer-Demenz	T4	AD	74	weib.	5,97	925,8	0,1153	0,2101	
Alzheimer-Demenz	T5	AD	85	weib.	5,96	491,1	0,081		
Alzheimer-Demenz	T7	AD	77	weib.	3,91	319,2	0,0361	0,0904	
Alzheimer-Demenz	T8	AD	76	weib.	5,22	607,1	0,0807	0,1438	
Alzheimer-Demenz	T9	AD	83	weib.	6,35	1844,2	0,102	0,3352	
Alzheimer-Demenz	T10	AD	84	weib.	2,34	419,3	0,0748	0,1818	
Alzheimer-Demenz	T11	AD	81	weib.	4,85	481,3	0,0566	0,1032	
Alzheimer-Demenz	T12	AD	76	weib.	4,57	358,3	0,0535	0,1038	
Alzheimer-Demenz	T14	AD	71	weib.	2,87	377,8	0,0636	0,2175	
Alzheimer-Demenz	T15	AD	83	weib.	3,75	390	0,0509	0,1134	
Alzheimer-Demenz	T18	AD	85	weib.	4,21	515,8	0,0647	0,139	
Alzheimer-Demenz	T18	AD	86	weib.	6,56	542,9	0,0577	0,1007	
Alzheimer-Demenz	T19	AD	76	weib.	4,93	686,9	0,0465		
Alzheimer-Demenz	T20	AD	82	weib.	5,43	1578,3	0,1186	0,2001	
Alzheimer-Demenz	T21	AD	58	weib.	4,67	1009,3	0,0774	0,1448	
Alzheimer-Demenz	T22	AD	59	weib.	2,33	730	0,0697	0,1383	
Alzheimer-Demenz	T26	AD	76	weib.	4,43	736,4	0,0609	0,1012	
Alzheimer-Demenz	T30, NP13	AD	66	weib.	4,49	1058,9	0,0773	0,1837	
Alzheimer-Demenz	T32, NP18	AD	66	weib.	4,32	1206,7	0,0609	0,1312	
Alzheimer-Demenz	T33, NP19	AD	66	weib.	1,95	475	0,0643		
Alzheimer-Demenz	T34, NP25	AD	75	weib.	3,77	300	0,0263		
Alzheimer-Demenz	T35, NP37	AD	70	weib.	3,59	378,8	0,0222	0,0824	

\* A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot nach immunoprecipitation: \* Quotient der Flächeneinheiten

Tabelle 13: A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-I von A $\beta$ -Peptiden im humanen lumbalen Liquor bei NDC-1 und AD-1 nach direkter Aufnahme der Proben in SDS-PAGE-Probenpuffer oder nach vorheriger Immunopräzipitation (Teilkollektiv).

Zusätzlich wurde die A $\beta_{1-42}$  Konzentration im Liquor bei AD-1 mittels eines kommerziellen ELISA<sub>A $\beta_{1-42}$</sub>  ermittelt;  
Statistische Kennwerte: gültiges N, Mittelwert, 95%-Konfidenzintervall, Median, Unteres-Oberes Quartil, Standardabweichung

	Kollektiv	Gült. N	Mittelw.	Konfid.-80%	Konfid.-95%	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stabh.
ALTER	AD	35	69,7	66,7	72,7	68,0	64,7	76,0	5,7
	NDC	30	83,5	56,2	68,6	66,6	56,3	74,4	14,2
A $\beta_{1-40}$ (ng/ml)	AD	35	5,8	4,1	7,1	4,6	3,7	8,0	4,4
	NDC	30	7,6	6,2	9,0	6,6	4,9	10,4	3,7
A $\beta_{1-42}$ (pg/ml)	AD	35	721,2	575,0	867,5	607,1	419,2	925,8	425,7
	NDC	30	1677,5	1364,0	1970,9	1533,3	1040,6	2009,2	785,9
A $\beta_{1-40}$ -IP, (pg/ml) <sup>§</sup>	AD	10	320,7	215,0	426,4	317,4	206,3	373,0	147,7
	NDC	20	457,5	380,4	534,6	411,6	356,1	557,8	164,8
A $\beta_{1-42}$ ELISA <sup>†</sup> (pg/ml)	AD	35	412,4	361,1	463,7	371,0	316,0	445,0	149,3
	NDC	30	1517,6	1173,1	1862,5	1299,7	759,7	2375,0	923,1
A $\beta_{1-37}$ (FE*)	AD	35	1031,8	794,0	1269,6	840,3	660,0	1243,3	692,3
	NDC	30	1517,6	1173,1	1862,5	1299,7	759,7	2375,0	923,1
A $\beta_{1-38}$ (FE*)	AD	35	3975,3	3445,1	4505,5	3931,7	2977,3	4907,7	1543,5
	NDC	30	5123,3	4420,2	5826,3	5035,3	3421,7	6658,3	1862,8
A $\beta_{1-39}$ (FE*)	AD	35	942,8	749,5	1138,2	923,0	545,7	1186,7	562,7
	NDC	30	1389,1	1101,9	1679,2	1176,7	726,0	2115,0	769,0
A $\beta_{1-40}$ (FE*)	AD	35	8499,1	7841,0	9157,3	8293,0	7545,5	9335,0	1916,0
	NDC	30	9748,3	9007,0	10469,5	9689,6	8556,0	11384,0	1985,2
A $\beta_{1-42}$ (FE*)	AD	35	732,7	539,7	925,6	563,3	416,3	811,7	561,6
	NDC	30	2003,1	1566,7	2448,5	1864,2	908,7	2593,7	1195,5
A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-40}$ **	AD	35	0,0803	0,0657	0,0948	0,0656	0,0535	0,0897	0,0424
	NDC	30	0,1947	0,1603	0,2281	0,1848	0,1112	0,2599	0,0922
A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-37}$ **	AD	31	0,1847	0,1532	0,2163	0,1616	0,1145	0,2132	0,0861
	NDC	29	0,3853	0,3302	0,4404	0,4065	0,2753	0,4919	0,1448

<sup>§</sup> A $\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot nach Immunopräzipitation (mAb 0E10)    \* Flächeneinheiten

\*\* Quotient der Flächeneinheiten    <sup>†</sup> Hulstaert et al., 1999, Neurology 52: 1555-62.

**Tabelle 14:** Vergleich der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1 mittels Mann-Whitney U-Test

	AD-1 (n)	NDC-1 (n)	p-Niveau
ALTER	35	30	0,1098
$A\beta_{1-40}$	35	30	0,0055
$A\beta_{1-42}$	35	30	1,23E-07
$A\beta_{1-42}$ IP <sup>3</sup>	10	20	0,0387
$A\beta_{42}/A\beta_{40}^*$	35	30	4,77E-08
$A\beta_{42}/A\beta_{38}^*$	31	29	3,49E-07

\*  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot nach Immunopräzipitation (mAb 6E10)

\* Quotient der Flächeneinheiten

**Tabelle 15:** Synopsis der diagnostischen Kennwerte (Spezifität, Sensitivität, max. Youden-Index, Grenzwertkonzentrationen) für  $A\beta_{1-42}$  und zugehörige  $A\beta$ -Peptidquotienten für die Differenzierung der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1.

	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	maximaler Youden-Index
$A\beta_{1-42}$ (pg/ml)	802.5	0.74	0.87	0.61
$A\beta_{42}/A\beta_{40}^*$	0.086	0.71	0.93	0.65
$A\beta_{42}/A\beta_{38}^*$	0.231	0.84	0.86	0.70

\* Quotient der Flächeneinheiten

Tabelle 16a: AB-SDS-PAGE/Immuno blot-1 von  $AB_{1-43}$  und  $AB_{1-40}$  im Liquor, Kollektiv NDC-2<sup>47</sup>. Vergleich der Kältepräzipitation nach Entfernen unbindendlicher Liquorproben (nativ\*) versus Vorbehandlung mit SDS-Hitzdenaturierung (SDS\*\*).

Patienten	Diagnose	$AB_{1-43}SDS^{**}$ pg/ml	$AB_{1-43}SDS^{**}$ pg/ml	$AB_{1-43}/AB_{1-40}SDS^{**}$	$AB_{1-43}nativ^{*}$ pg/ml	$AB_{1-43}nativ^{*}$ pg/ml	$AB_{1-43}/AB_{1-40}nativ^{*}$
NP51	Angsterkrankung	1543,0	7830,0	0,1971	858,3	7473,0	0,1146
NP53	Epilepsie	1888,0	7889,0	0,2399	1348,3	7714,0	0,1746
NP47	Horner-Syndrom	1588,7	7753,3	0,2049	891,7	7156,7	0,1388
NP48	Depression	1826,3	7911,3	0,2435	1128,0	6821,7	0,1854
NP54	Disruptiv (BWS)	1587,3	5257,0	0,2859	1277,0	8532,7	0,2537
NP55	Zerebrale Ischämie	2578,0	7985,0	0,3229	1707,0	8103,7	0,2106
NP56	Depression	2183,3			1437,7		
NP57	Katatonies Syndrom	1477,7	4292,0	0,3443	1261,7	4744,3	0,2659
NP58	primär progredientes Demenz ungekl. Genese	2285,3	8377,7	0,2728	1734,7	7942,8	0,2184
NP60	Neurosarkoidose	965,7	6818,0	0,1416	853,0	9411,7	0,1018
MW		1782,3	7121,6	0,2479	1239,8	6822,2	0,1827
SD		457,1	1332,8	0,0592	328,8	1150,8	0,0553
VK		25,8	18,7	23,8	28,5	18,8	30,3

Tabelle 16b: Absolute und prozentuale Kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von  $AB_{1-40}$ ,  $AB_{1-43}$  und des AB-Peptidquotienten für das Kollektiv NDC-2<sup>47</sup> (Differenzwertabete zu Tabelle 16a)

Patienten	Diagnose	$\Delta AB_{1-43}$	$\Delta AB_{1-40}$	$\Delta AB_{1-43}/AB_{1-40}$	$\Delta AB_{1-43}/AB_{1-40}$	$\Delta AB_{1-43}/AB_{1-40}$	$\Delta AB_{1-43}/AB_{1-40}$
NP51	Angsterkrankung	-686,7	-44,5	-357,0	-4,8	-0,0625	-41,9
NP53	Epilepsie	-539,7	-28,6	-155,0	-2,0	-0,0651	-27,1
NP47	Horner-Syndrom	-597,0	-37,8	-596,7	-7,7	-0,3663	-32,4
NP48	Depression	-786,3	-41,4	-1089,7	-13,8	-0,0781	-32,1
NP54	Disruptiv (BWS)	-110,3	-8,0	-224,3	-4,3	-0,1102	-3,8
NP55	Zerebrale Ischämie	-571,0	-33,8	118,7	1,5	-0,1122	-34,8
NP56	Depression	-745,7	-34,2				
NP57	Katatonies Syndrom	-218,0	-14,6	452,3	10,5	-0,0784	-22,8
NP58	primär progredientes Demenz ungekl. Genese	-550,7	-24,1	-435,7	-5,2	-0,0544	-19,8
NP60	Neurosarkoidose	-312,7	-32,4	-405,3	-6,0	-0,0398	-28,1
MW		-442,8	-28,9	-299,3	-3,8	-0,0662	-27,8
SD		241,8	10,9	410,0	6,3	0,0272	10,2
VK		44,5	36,6	137,0	180,8	41,7	37,8

\*  $\Delta AB_{1-43}/AB_{1-40} = (AB_{1-43}nativ - AB_{1-43}SDS) / AB_{1-40}SDS \cdot 100$

Negatives (positives)  $\Delta AB_{1-43}$  oder  $\Delta AB_{1-40}$  bedeutet niedrigere (höhere) AB-Peptidkonzentration der nativ eingefrorenen Liquorprobe bezogen auf Vorbehandlung der Probe mit SDS-Hitzdenaturierung

Tabelle 17: Das Signifikanzniveau der Kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung der AB-Peptide wurde für das Kollektiv NDC-2<sup>47</sup> mittels des Wilcoxon Test für gepaarte Proben ermittelt (vergl. Tabelle 16a).

$AB_{1-43}SDS$ $AB_{1-43}nativ$	Vertrag	$AB_{1-40}SDS$ $AB_{1-40}nativ$	$AB_{1-43}/AB_{1-40}SDS$ vertrug	
10	8	8	n	
0,0051	0,0858	0,0077	p-Wert	

Tabelle 18a: Intrassay-Variationskoeffizient bei AP-SDS-PAGE/Immunoblot-2 unter Verwendung von Rotiblock und ECL-Detektion mittels CCD-Kamera. Die AP-Peptide wurden pro Western-Immunoblot (M1-M4) jeweils vierfach aufgetragen.

	60pg					20pg				
	AP <sub>1-36</sub>	AP <sub>1-42</sub>	AP <sub>1-44</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-42</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-44</sub>	AP <sub>1-36</sub>	AP <sub>1-42</sub>	AP <sub>1-44</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-42</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-44</sub>
Intrassay-VK M1	5,47	4,47	4,28	2,32	2,14	5,34	5,92	3,15	6,22	7,48
Intrassay-VK M2	6,19	4,05	5,90	4,02	4,68	4,41	6,88	6,97	3,67	7,92
Intrassay-VK M3	5,75	5,39	2,59	5,43	5,52	12,82	4,12	1,27	3,01	12,21
Intrassay-VK M4	6,16	6,79	2,87	4,28	4,53	2,20	4,90	4,86	2,63	5,27
Mean Intrassay-VK	5,89	5,18	3,91	4,01	4,22	6,19	5,95	4,56	3,88	6,22
SD Intrassay-VK	0,30	1,05	1,32	1,11	1,26	3,99	1,80	2,94	1,40	2,51

Tabelle 18b: Interassay-Variationskoeffizient bei AP-SDS-PAGE/Immunoblot-2 unter Verwendung von Rotiblock und ECL-Detektion mittels CCD-Kamera. Die Meßwerte beziehen sich auf die Volumendatensätze einer Bande nach Hintergrundkorrektur und entsprechen den Mittelwerten (MW) einer Vierfachbestimmung pro Western-Immunoblot (vergl. Tabelle 10). Die Western-Immunoblots (M1-M4) entsprechen unabhängig durchgeführten Elektrophoresen.

	60pg					20pg				
	AP <sub>1-36</sub>	AP <sub>1-42</sub>	AP <sub>1-44</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-42</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-44</sub>	AP <sub>1-36</sub>	AP <sub>1-42</sub>	AP <sub>1-44</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-42</sub>	AP <sub>27-36</sub> /AP <sub>27-44</sub>
MW M1	46452,20	52114,60	28568,20	0,55	0,62	6817,50	7106,25	2963,50	0,42	0,44
MW M2	46415,60	51925,00	27217,20	0,52	0,59	6822,50	6774,00	3253,75	0,48	0,49
MW M3	51619,25	55606,75	30266,50	0,55	0,59	7430,75	7544,25	3028,00	0,40	0,41
MW M4	45169,00	60431,50	29304,00	0,56	0,65	7511,00	8251,60	3767,60	0,46	0,50
Total Mean	47414,08	52519,46	28838,98	0,55	0,61	7095,44	7419,03	3253,21	0,44	0,46
SD	2482,22	1897,91	1113,26	0,02	0,03	382,77	552,89	315,93	0,03	0,04
Interassay-VK	6,24	3,61	3,86	3,81	4,23	5,39	7,46	9,71	7,09	8,02



**Tabelle 20:** Aβ-SDS-PAGE/Immunoblot-2; Aβ-Peptide im Liquor, ApoE-Genotypisierung und MMSE Testergebnisse der Patientenkollektive NDC-3 und AD-3 mit zugehörigen Untergruppen.

Gruppen	Patienten			MMSE			FUBA			AP-1			AP-2			AP-3			AP-4			total AP			AP-5			AP-6			AP-7			AP-8			AP-9			AP-10			AP-11			AP-12			AP-13			AP-14			AP-15			AP-16			AP-17			AP-18			AP-19			AP-20			AP-21			AP-22			AP-23			AP-24			AP-25			AP-26			AP-27			AP-28			AP-29			AP-30			AP-31			AP-32			AP-33			AP-34			AP-35			AP-36			AP-37			AP-38			AP-39			AP-40			AP-41			AP-42			AP-43			AP-44			AP-45			AP-46			AP-47			AP-48			AP-49			AP-50			AP-51			AP-52			AP-53			AP-54			AP-55			AP-56			AP-57			AP-58			AP-59			AP-60			AP-61			AP-62			AP-63			AP-64			AP-65			AP-66			AP-67			AP-68			AP-69			AP-70			AP-71			AP-72			AP-73			AP-74			AP-75			AP-76			AP-77			AP-78			AP-79			AP-80			AP-81			AP-82			AP-83			AP-84			AP-85			AP-86			AP-87			AP-88			AP-89			AP-90			AP-91			AP-92			AP-93			AP-94			AP-95			AP-96			AP-97			AP-98			AP-99			AP-100			AP-101			AP-102			AP-103			AP-104			AP-105			AP-106			AP-107			AP-108			AP-109			AP-110			AP-111			AP-112			AP-113			AP-114			AP-115			AP-116			AP-117			AP-118			AP-119			AP-120			AP-121			AP-122			AP-123			AP-124			AP-125			AP-126			AP-127			AP-128			AP-129			AP-130			AP-131			AP-132			AP-133			AP-134			AP-135			AP-136			AP-137			AP-138			AP-139			AP-140			AP-141			AP-142			AP-143			AP-144			AP-145			AP-146			AP-147			AP-148			AP-149			AP-150			AP-151			AP-152			AP-153			AP-154			AP-155			AP-156			AP-157			AP-158			AP-159			AP-160			AP-161			AP-162			AP-163			AP-164			AP-165			AP-166			AP-167			AP-168			AP-169			AP-170			AP-171			AP-172			AP-173			AP-174			AP-175			AP-176			AP-177			AP-178			AP-179			AP-180			AP-181			AP-182			AP-183			AP-184			AP-185			AP-186			AP-187			AP-188			AP-189			AP-190			AP-191			AP-192			AP-193			AP-194			AP-195			AP-196			AP-197			AP-198			AP-199			AP-200			AP-201			AP-202			AP-203			AP-204			AP-205			AP-206			AP-207			AP-208			AP-209			AP-210			AP-211			AP-212			AP-213			AP-214			AP-215			AP-216			AP-217			AP-218			AP-219			AP-220			AP-221			AP-222			AP-223			AP-224			AP-225			AP-226			AP-227			AP-228			AP-229			AP-230			AP-231			AP-232			AP-233			AP-234			AP-235			AP-236			AP-237			AP-238			AP-239			AP-240			AP-241			AP-242			AP-243			AP-244			AP-245			AP-246			AP-247			AP-248			AP-249			AP-250			AP-251			AP-252			AP-253			AP-254			AP-255			AP-256			AP-257			AP-258			AP-259			AP-260			AP-261			AP-262			AP-263			AP-264			AP-265			AP-266			AP-267			AP-268			AP-269			AP-270			AP-271			AP-272			AP-273			AP-274			AP-275			AP-276			AP-277			AP-278			AP-279			AP-280			AP-281			AP-282			AP-283			AP-284			AP-285			AP-286			AP-287			AP-288			AP-289			AP-290			AP-291			AP-292			AP-293			AP-294			AP-295			AP-296			AP-297			AP-298			AP-299			AP-300			AP-301			AP-302			AP-303			AP-304			AP-305			AP-306			AP-307			AP-308			AP-309			AP-310			AP-311			AP-312			AP-313			AP-314			AP-315			AP-316			AP-317			AP-318			AP-319			AP-320			AP-321			AP-322			AP-323			AP-324			AP-325			AP-326			AP-327			AP-328			AP-329			AP-330			AP-331			AP-332			AP-333			AP-334			AP-335			AP-336			AP-337			AP-338			AP-339			AP-340			AP-341			AP-342			AP-343			AP-344			AP-345			AP-346			AP-347			AP-348			AP-349			AP-350			AP-351			AP-352			AP-353			AP-354			AP-355			AP-356			AP-357			AP-358			AP-359			AP-360			AP-361			AP-362			AP-363			AP-364			AP-365			AP-366			AP-367			AP-368			AP-369			AP-370			AP-371			AP-372			AP-373			AP-374			AP-375			AP-376			AP-377			AP-378			AP-379			AP-380			AP-381			AP-382			AP-383			AP-384			AP-385			AP-386			AP-387			AP-388			AP-389			AP-390			AP-391			AP-392			AP-393			AP-394			AP-395			AP-396			AP-397			AP-398			AP-399			AP-400			AP-401			AP-402			AP-403			AP-404			AP-405			AP-406			AP-407			AP-408			AP-409			AP-410			AP-411			AP-412			AP-413			AP-414			AP-415			AP-416			AP-417			AP-418			AP-419			AP-420			AP-421			AP-422			AP-423			AP-424			AP-425			AP-426			AP-427			AP-428			AP-429			AP-430			AP-431			AP-432			AP-433			AP-434			AP-435			AP-436			AP-437			AP-438			AP-439			AP-440			AP-441			AP-442			AP-443			AP-444			AP-445			AP-446			AP-447			AP-448			AP-449			AP-450			AP-451			AP-452			AP-453			AP-454			AP-455			AP-456			AP-457			AP-458			AP-459			AP-460			AP-461			AP-462			AP-463			AP-464			AP-465			AP-466			AP-467			AP-468			AP-469			AP-470			AP-471			AP-472			AP-473			AP-474			AP-475			AP-476			AP-477			AP-478			AP-479			AP-480			AP-481			AP-482			AP-483			AP-484			AP-485			AP-486			AP-487			AP-488			AP-489			AP-490			AP-491			AP-492			AP-493			AP-494			AP-495			AP-496			AP-497			AP-498			AP-499			AP-500			AP-501			AP-502			AP-503			AP-504			AP-505			AP-506			AP-507			AP-508			AP-509			AP-510			AP-511			AP-512			AP-513			AP-514			AP-515			AP-516			AP-517			AP-518			AP-519			AP-520			AP-521			AP-522			AP-523			AP-524			AP-525			AP-526			AP-527			AP-528			AP-529			AP-530			AP-531			AP-532			AP-533			AP-534			AP-535			AP-536			AP-537			AP-538			AP-539			AP-540			AP-541			AP-542			AP-543			AP-544			AP-545			AP-546			AP-547			AP-548			AP-549			AP-550			AP-551			AP-552			AP-553			AP-554			AP-555			AP-556			AP-557			AP-558			AP-559			AP-560			AP-561			AP-562			AP-563			AP-564			AP-565			AP-566			AP-567			AP-568			AP-569			AP-570			AP-571			AP-572			AP-573			AP-574			AP-575			AP-576			AP-577			AP-578			AP-579			AP-580			AP-581			AP-582			AP-583			AP-584			AP-585			AP-586			AP-587			AP-588			AP-589			AP-590			AP-591			AP-592			AP-593			AP-594			AP-595			AP-596			AP-597			AP-598			AP-599			AP-600			AP-601			AP-602			AP-603			AP-604			AP-605			AP-606			AP-607			AP-608			AP-609			AP-610			AP-611			AP-612			AP-613			AP-614			AP-615			AP-616			AP-617			AP-618			AP-619			AP-620			AP-621			AP-622			AP-623			AP-624			AP-625			AP-626			AP-627			AP-628			AP-629			AP-630			AP-631			AP-632			AP-633			AP-634			AP-635			AP-636			AP-637			AP-638			AP-639			AP-640			AP-641			AP-642			AP-643			AP-644			AP-645			AP-646			AP-647			AP-648			AP-649			AP-650			AP-651			AP-652			AP-653			AP-654			AP-655			AP-656			AP-657			AP-658			AP-659			AP-660			AP-661			AP-662			AP-663			AP-664			AP-665			AP-666			AP-667			AP-668			AP-669			AP-670			AP-671			AP-672			AP-673			AP-674			AP-675			AP-676			AP-677			AP-678			AP-679			AP-680			AP-681			AP-682			AP-683			AP-684			AP-685			AP-686			AP-687			AP-688			AP-689			AP-690			AP-691			AP-692			AP-693			AP-694			AP-695			AP-696			AP-697			AP-698			AP-699			AP-700			AP-701			AP-702			AP-703			AP-704			AP-705			AP-706			AP-707			AP-708			AP-709			AP-710			AP-711			AP-712			AP-713			AP-714			AP-715			AP-716			AP-717			AP-718			AP-719			AP-720			AP-721			AP-722			AP-723			AP-724			AP-725			AP-726			AP-727			AP-728			AP-729			AP-730			AP-731			AP-732			AP-733			AP-734			AP-735			AP-736			AP-737			AP-738			AP-739			AP-740			AP-741			AP-742			AP-743			AP-744			AP-745			AP-746			AP-747			AP-748			AP-749			AP-750			AP-751			AP-752			AP-753			AP-754			AP-755			AP-756			AP-757			AP-758			AP-759			AP-760			AP-761			AP-762			AP-763			AP-764			AP-765			AP-766			AP-767			AP-768			AP-769			AP-770			AP-771			AP-772			AP-773			AP-774			AP-775			AP-776			AP-777			AP-778			AP-779			AP-780			AP-781			AP-782			AP-783			AP-784			AP-785			AP-786			AP-787			AP-788			AP-789			AP-790			AP-791			AP-792			AP-793			AP-794			AP-795			AP-796			AP-797			AP-798			AP-799			AP-800			AP-801			AP-802			AP-803			AP-804			AP-805			AP-806			AP-807			AP-808			AP-809			AP-810			AP-811			AP-812			AP-813			AP-814			AP-815			AP-816			AP-817			AP-818			AP-819			AP-820			AP-821			AP-822			AP-823			AP-824			AP-825			AP-826			AP-827			AP-828			AP-829			AP-830			AP-831			AP-832			AP-833			AP-834			AP-835			AP-836			AP-837			AP-838			AP-839			AP-840			AP-841			AP-842			AP-843			AP-844			AP-845			AP-846			AP-847			AP-848			AP-849			AP-850			AP-851			AP-852			AP-853			AP-854			AP-855			AP-856			AP-857			AP-858			AP-859			AP-860			AP-861			AP-862			AP-863			AP-864			AP-865			AP-866			AP-867			AP-868			AP-869			AP-870			AP-871			AP-872			AP-873			AP-874			AP-875			AP-876			AP-877			AP-878			AP-879			AP-880			AP-881			AP-882			AP-883			AP-884			AP-885			AP-886			AP-887			AP-888			AP-889			AP-890			AP-891			AP-892			AP-893			AP-894			AP-895			AP-896			AP-897			AP-898			AP-899			AP-900			AP-901			AP-902			AP-903			AP-904			AP-905			AP-906			AP-907			AP-908			AP-909			AP-910			AP-911			AP-912			AP-913			AP-914			AP-915			AP-916			AP-917			AP-918			AP-919			AP-920			AP-921			AP-922			AP-923			AP-924			AP-925			AP-926			AP-927			AP-928			AP-929			AP-930			AP-931			AP-932			AP-933			AP-934			AP-935			AP-936			AP-937			AP-938			AP-939			AP-940			AP-941			AP-942			AP-943			AP-944			AP-945			AP-946			AP-947			AP-948			AP-949			AP-950			AP-951			AP-952			AP-953			AP-954			AP-955			AP-956			AP-95		
---------	-----------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	----------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	--------	--	--	-------	--	--

n.a.: nicht erhältlich • MMSE Testergebnisse liegen bei 5 der 47 NDC-3 Patienten nicht vor <sup>1)</sup> A $\beta$ -Peptidgesamtkonz.

<sup>3</sup> Prozentueller Anteil der jeweiligen A $\beta$ -Peptidspecies an der Gesamtkonzentration

1) Welche der folgenden Aussagen sind richtig (R) oder falsch (F)?

<sup>a)</sup> Nicht-demente neuropsychiatrische Kontrollpatienten

ed) Immunopräzipitation und A $\beta$ -SDS-PAGE/immunoblot-2 von gepaarten <sup>a)</sup>Plasma / <sup>a)</sup>Liquorproben bei fünf Patienten der Gruppe NDC-3

• Immunopräparation und Applikationstechnik von Gelenen / Flüssig- / Exsponaten bei der

\*1) SDS-Heatdenaturierung mit Aβ-SDS-PAGE/immunoblot-2 von Liquorproben der fünf NDC-3 Patienten,

für die gepaarte Plasma/Liquorproben vorliegen

Tabelle 21: Bestimmung von  $A\beta_{1-42}$  im Liquor mittels  $A\beta$ -SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera:  
Vergleich der Kältepräzipitation nach Einfrieren unbehandelter Liquorproben (nativ\*)  
versus Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung (SDS\*\*) für die Kollektive NDC-3<sup>KP</sup> und AD-3<sup>KP</sup>

P-CODE	Alter	Geschlecht	Diagnose	D-Code	MMSE <sup>†</sup>	$A\beta_{1-42}$ nativ* pg/ml	$A\beta_{1-42}$ SDS** pg/ml	$\Delta A\beta_{1-42}$ % <sup>§</sup>	ApoE <sup>‡</sup>
NP45	76	F	Alzheimer Demenz	AD	5	1464,00	1431,75	2,25	3/4
NP52	68	F	Alzheimer Demenz	AD	11	1588,00	1390,50	14,06	3/4
NP58	83	F	Alzheimer Demenz	AD	20	2074,00	1775,50	16,81	3/4
NP66	87	F	Alzheimer Demenz	AD	1	1498,25	1572,00	-4,69	3/4
NP69	62	M	Alzheimer Demenz	AD	n.a.	960,75	901,75	6,54	n.a.
NP111	84	F	Alzheimer Demenz	AD	15	2020,00	2182,50	-7,45	3/4
NP143	55	M	Alzheimer Demenz	AD	27	886,00	965,00	-8,19	2/4
NP190	79	F	Alzheimer Demenz	AD	19	657,50	718,50	-8,23	3/4
NP197	64	F	Alzheimer Demenz	AD	n.a.	699,75	825,00	-15,18	n.a.
NP213	32	M	Depressive Störung mit psychotischen Merkmalen	NDC (OND)	30	2068,50	2166,25	-4,60	3/3
NP319	72	F	Alzheimer Demenz	AD	28	872,25	913,00	-4,46	4/4
NP320	70	F	Alzheimer Demenz	AD	25	1551,25	1705,00	-9,02	2/4
NP344	36	F	Somatoforme (konversionsneurotische) Störung	NDC (OND)	28	2012,00	2688,00	-25,15	3/3
NP345	34	M	Panikstörung mit Agoraphobie	NDC (OND)	n.a.	2879,75	3788,75	-23,99	3/3
NP352	45	F	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	29	4589,75	5878,75	-21,93	3/3
NP355	31	F	zentrierte transitorische ischämische Attacke	NDC (OND)	30	4931,75	5266,75	-6,38	3/3
NP358	85	F	Polyzystische vena mit transitorisch ischämischen Attacken	NDC (OND)	30	1285,50	2858,00	-55,02	3/4
NP364	58	M	Epilepsie	NDC (OND)	28	2450,25	2982,50	-17,85	2/3
NP374	43	M	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	30	1562,75	3326,25	-53,02	3/4
NP402	66	F	Hemiparese	NDC (OND)	30	1714,50	3004,50	-42,94	3/4
NP412	48	M	Depressive Störung bei subkortikaler arteriosklerotischer Enzephalopathie	NDC (OND)	30	1560,25	2961,75	-47,32	3/3
NP419	46	M	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	n.a.	1411,75	2154,50	-34,47	3/3
NP421	60	M	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung mit primär progressiver Agitation	NDC (CID)	30	2145,50	2967,75	-27,71	3/3
NP457	24	M	Depressive Episode bei bipolar affektiver Psychose, Typ I	NDC (OND)	30	2164,67	2156,67	0,37	2/3
NP480	20	M	chronisch entzündliche ZNS-Prozess	NDC (CID)	30	4349,50	4789,75	-9,19	3/3
NP526	51	M	Depressive Störung bei subkortikaler arteriosklerotischer Enzephalopathie	NDC (OND)	29	3397,00	3412,75	-0,46	3/3

<sup>§</sup>  $\Delta A\beta_{nativ} \% = (A\beta_{nativ} - A\beta_{nativ}SDS) / A\beta_{nativ}SDS * 100$

Negatives (positives)  $\Delta A\beta_{1-42}$  bedeutet niedrigere (höhere)  $A\beta$ -Peptidkonzentration der nativ eingefrorenen Liquorprobe bezogen auf Vorbehandlung der Probe mit SDS-/Hitzenaturierung

<sup>‡</sup> ApoE-Genotypisierung

<sup>†</sup> Mini Mental Status Examination

n.a. = nicht vorhanden

## Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper, der als mAb 1E8 bezeichnet wird, der bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, am 19.12.2000 hinterlegt wurde und dem die DSMZ-Aufnahmeanummer DSM ACC2485 zugeordnet wurde.
2. Antikörper mAb 1E8 nach Anspruch 1, der radioaktiv markiert ist.
3. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 1 oder 2 zum Nachweis von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x und/oder A $\beta$ 2-x und/oder sAPP $\alpha$ .
4. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 3 in einem Western-Immunoblot.
5. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass unspezifische Bindungsstellen zuvor mit einem Blockiermittel blockiert werden.
6. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die A $\beta$ -Peptide und das sAPP $\alpha$  zuvor durch eine Natrium-Laurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) voneinander getrennt werden, wobei durch Harnstoffzugabe eine Aminosäureprimärsequenz-spezifische Konformationsänderung der A $\beta$ -Peptide induziert wird.
7. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die A $\beta$  Peptide zuvor durch isoelektrische Fokussierung separiert werden.
8. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, eine Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 bestimmt wird.
9. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, auf das Vorliegen einer nachweisbaren Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 überprüft wird, die bei 100 pg/ml oder höher liegt.
10. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 8 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Verhältnis zwischen der Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 2-42 zu der Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 in der Probe bestimmt wird.
11. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, mindestens ein Konzentrationsverhältnis bestimmt wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, welche ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40, ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 und ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 zu einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40 umfasst.
12. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, mindestens ein relativer Anteil A $\beta$ 1-n% einer Konzentration eines A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-n an einer Konzentration von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x bestimmt wird, wobei der relative Anteil A $\beta$ 1-n% aus der Gruppe ausgewählt ist, welche einen relativen Anteil A $\beta$ 1-42% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42, einen relativen Anteil A $\beta$ 1-40% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-40 und einen relativen Anteil A $\beta$ 1-38% einer Konzentration des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-38 umfasst, und wobei die Konzentration von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x mindestens die Konzentration der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 aus der Gruppe der A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 1-37, A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 umfasst.
13. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die A $\beta$ -Peptide zuvor durch eine Behandlung mit einem Detergenz aufgeschlossen werden.
14. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die A $\beta$ -Peptide durch

eine SDS-Hitzedenaturierung aufgeschlossen werden.

15. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 8 und 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probe in mindestens zwei Teilproben unterteilt wird, dass eine erste Teilprobe der Probenbehandlung mit dem Detergenz vor oder statt einer Präzipitationsbehandlung unterworfen wird, die zumindest auf Teilmengen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 gerichtet ist und die an einer zweiten Teilprobe vor oder statt der Probenbehandlung mit dem Detergenz vorgenommen wird, und dass eine Differenz  $\Delta$ A $\beta$ 1-42 zwischen den in beiden Probenteilen bestimmten Konzentrationen des A $\beta$ -Peptids A $\beta$ 1-42 bestimmt wird.
16. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** die A $\beta$ -Peptide, an die der Antikörper mAb 1E8 gebunden ist, mit einem gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichtete sekundären Antikörper markiert werden.
17. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** der gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichtete sekundäre Antikörper bereits mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen ist oder nach seiner Immunreaktion mit dem Antikörper mAb 1E8 mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen wird.
18. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Menge des markierten Antikörper mAb 1E8 photometrisch mit einer CCD-Kamera bestimmt wird.
19. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 1 oder 2 zum Aufkonzentrieren von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x.
20. Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 nach Anspruch 1 oder 2 zur Unterscheidung von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ 1-x und A $\beta$ 2-x von A $\beta$ -Peptiden A $\beta$ n-x mit n>2.

Fig. 1

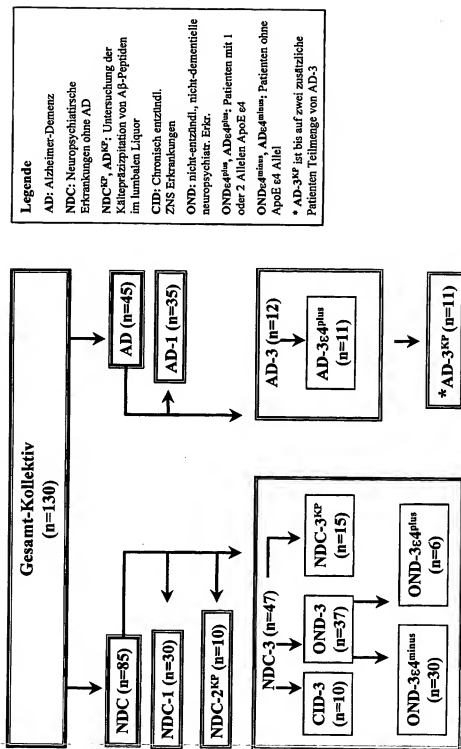


Fig. 2

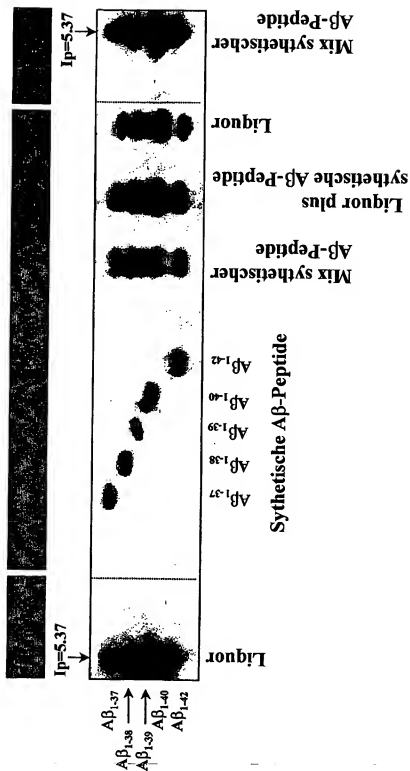


Fig. 3

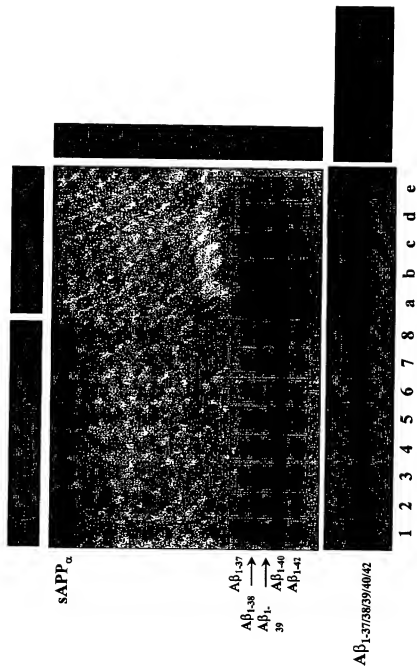


Fig. 4

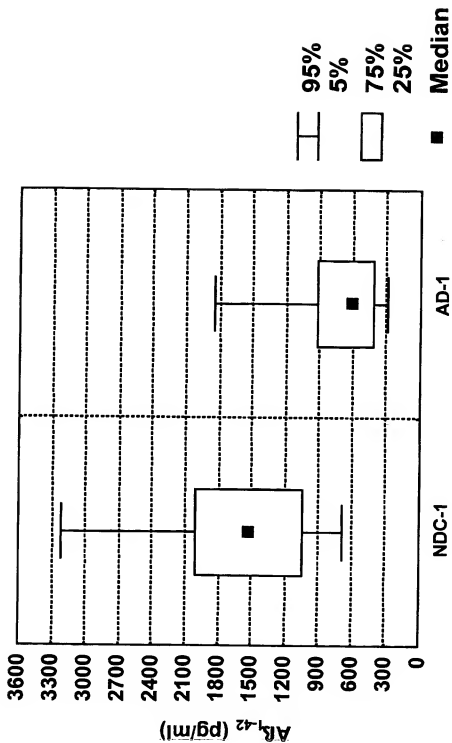


Fig. 5

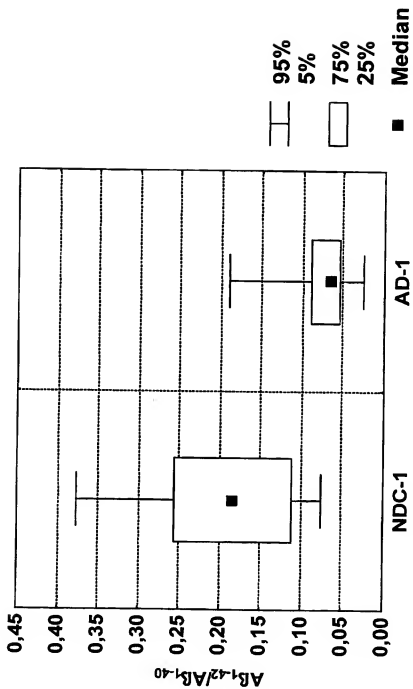


Fig. 6

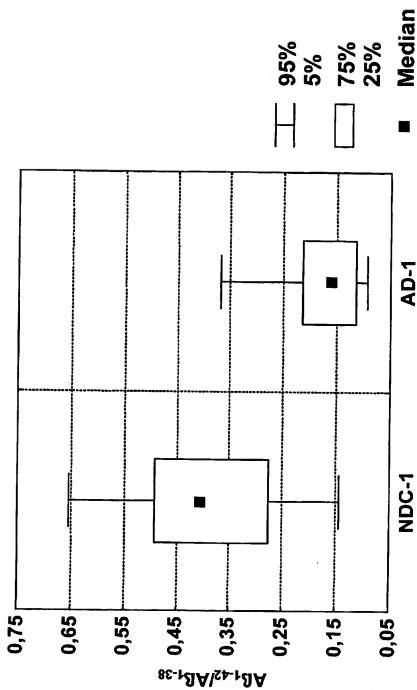


Fig. 7

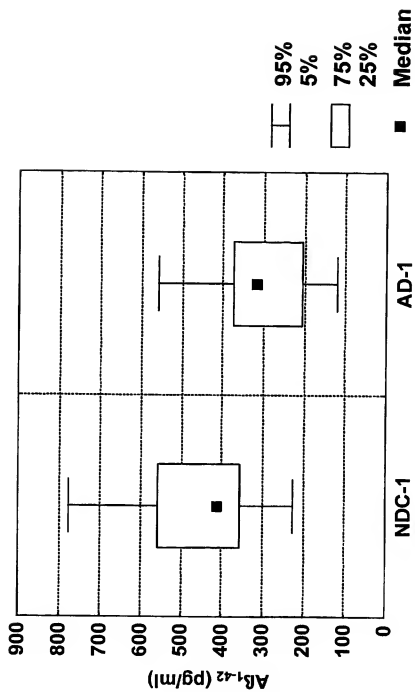


Fig. 8

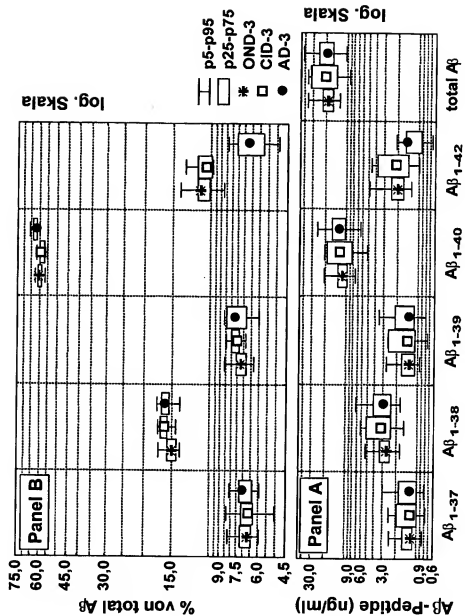


Fig. 9

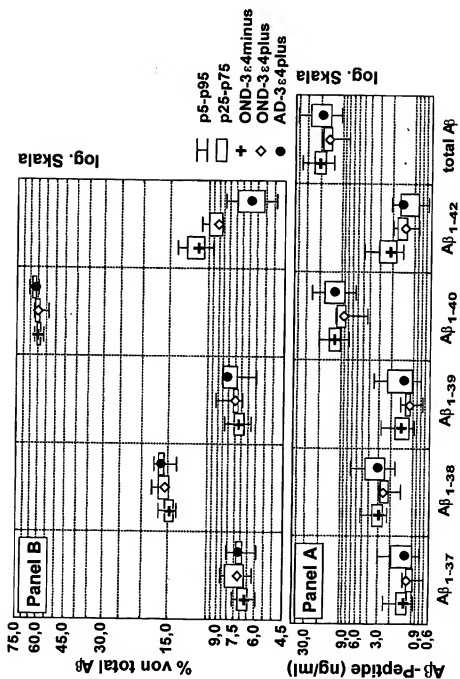


Fig. 10

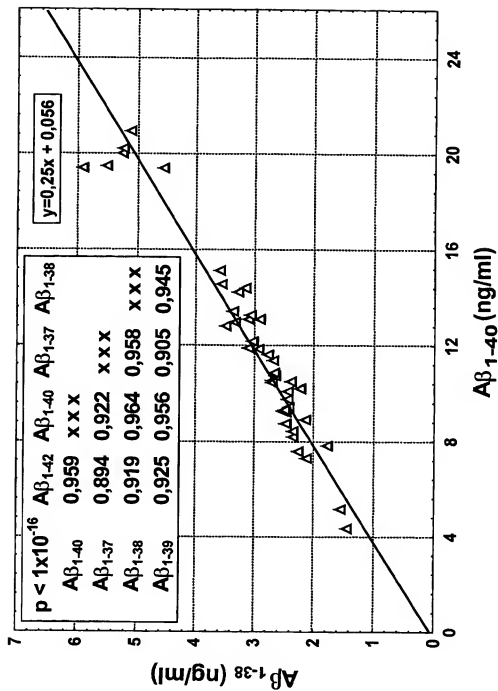


Fig. 11

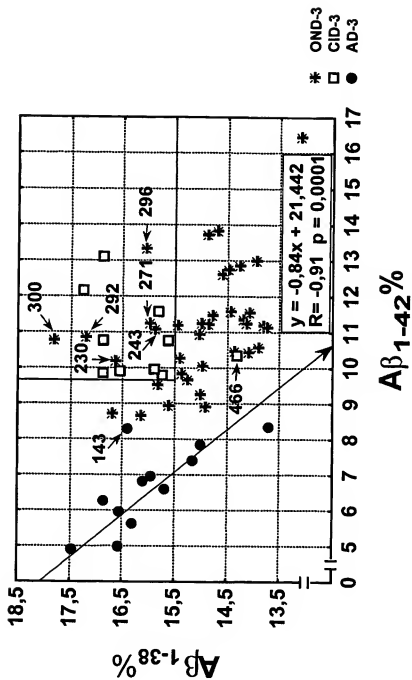


Fig 12

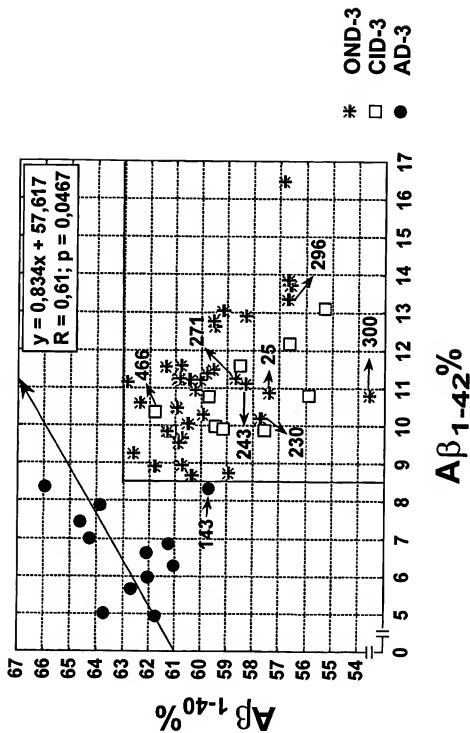


Fig. 13

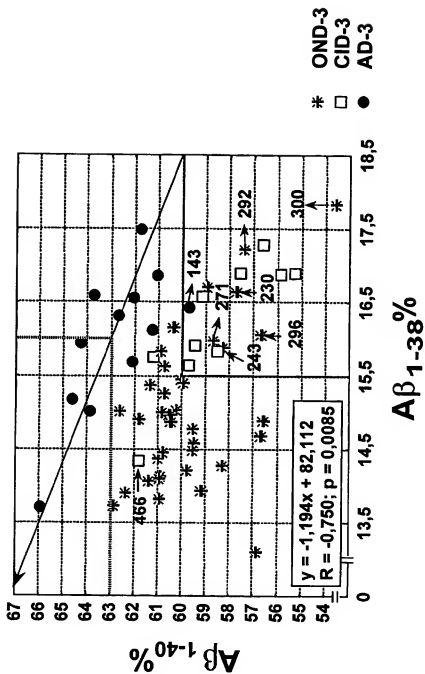


Fig. 14

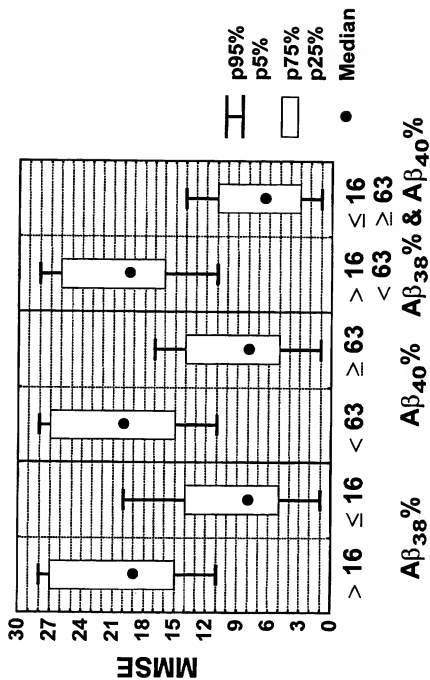


Fig. 15

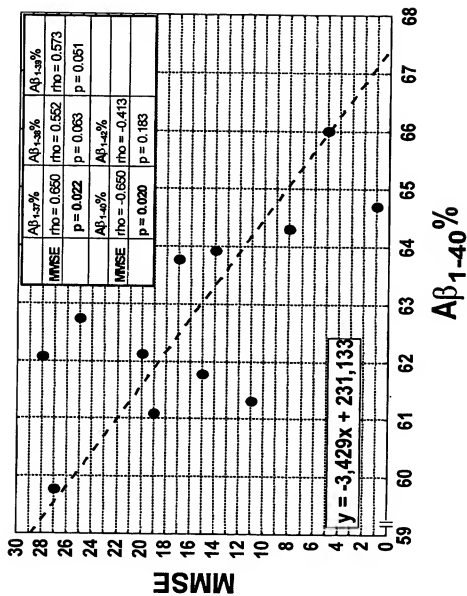


Fig. 16

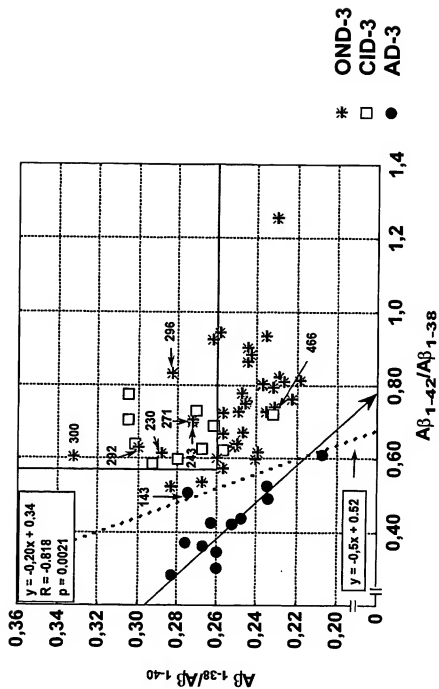


Fig. 17

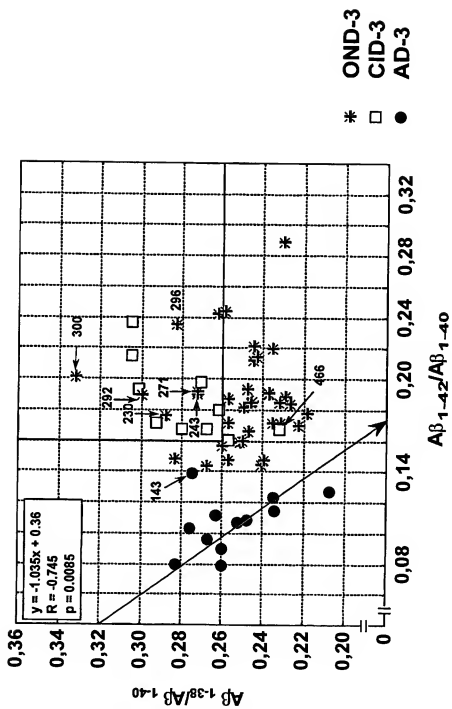


Fig. 18

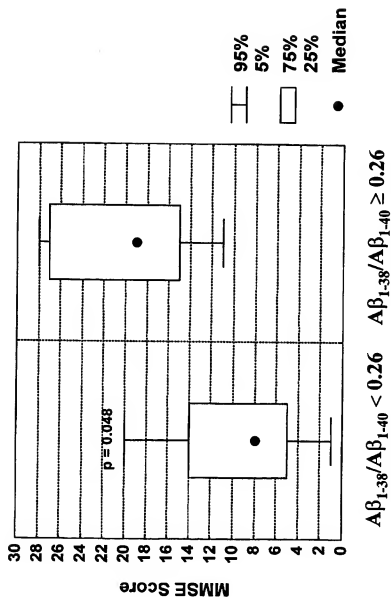


Fig. 19

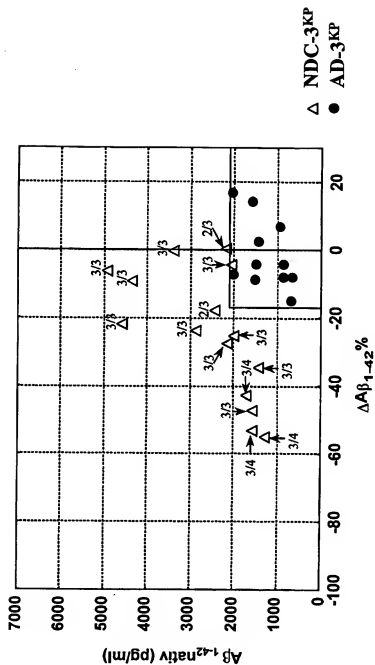


Fig. 20

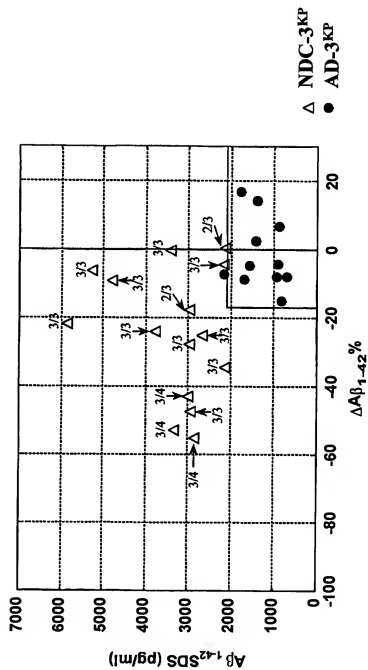


Fig. 21a

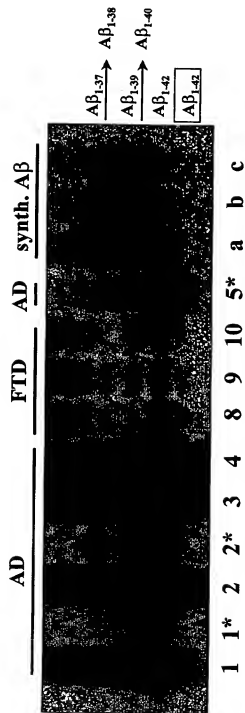


Fig. 21b

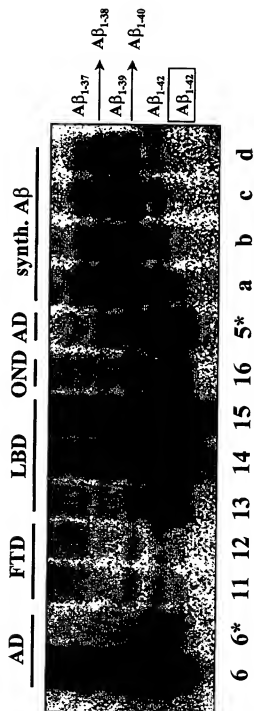


Fig. 22

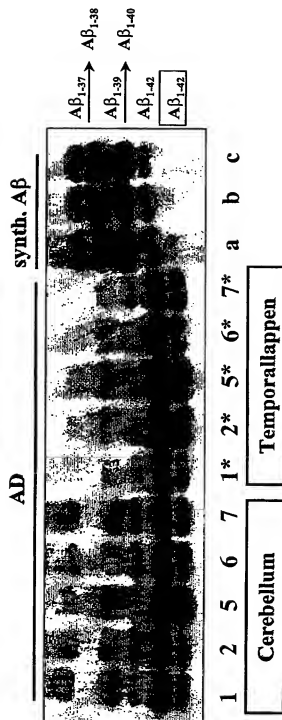


Fig. 23a

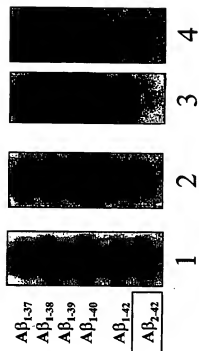


Fig. 23b

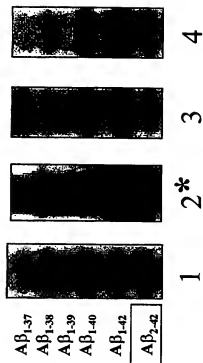


Fig 24

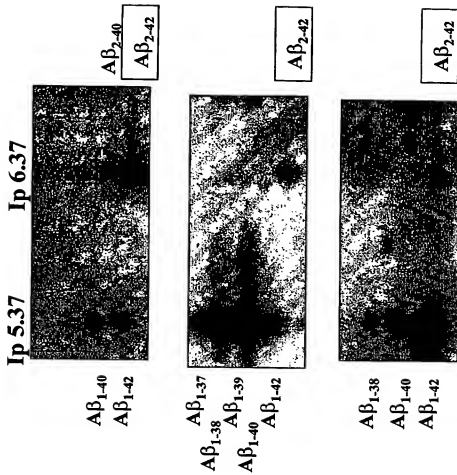


Fig. 25a

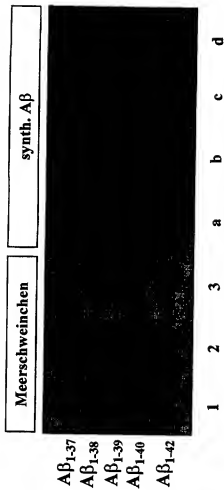


Fig. 25 b

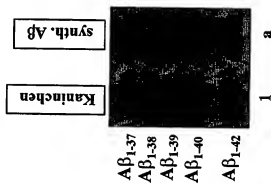


Fig. 26

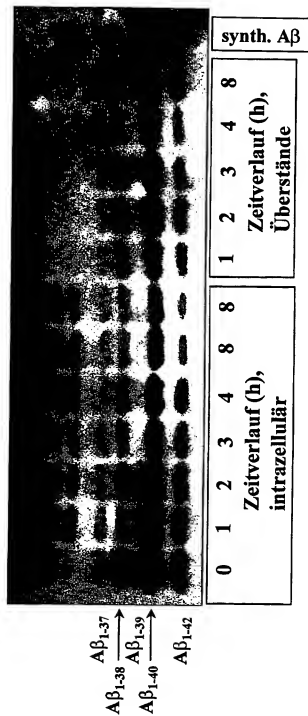


Fig 27

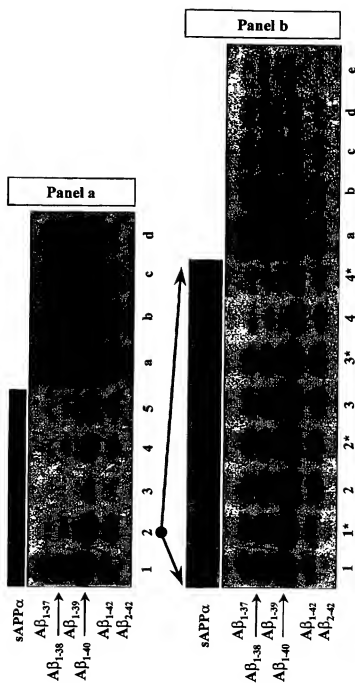


Fig 28a

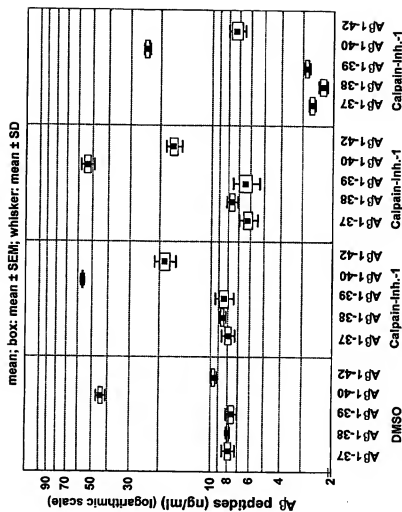
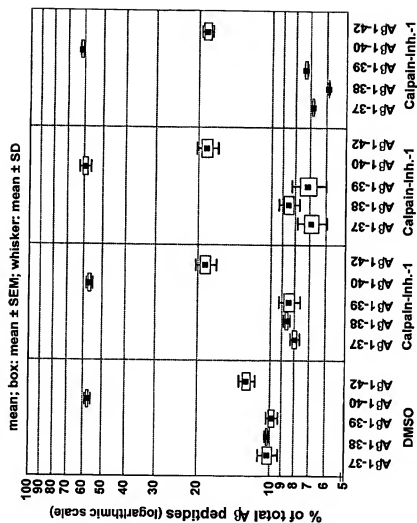


Fig 28b





Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 01 11 4192

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	CHEVALLIER N ET AL: "CATHEPSIN D DISPLAYS IN VITRO BETA-SECRETASE-LIKE SPECIFICITY" BRAIN RESEARCH, AMSTERDAM, NL, Bd. 750, Nr. 1/2, 1997, Seiten 11-19, XP000921314 ISSN: 0006-8993 * Seite 13 *	1-20	C07K16/18 G01N33/561 G01N33/539 G01N33/577 G01N33/541 G01N33/68 G01N33/50
A	TAKAOMI COMINGS SAIDO ET AL: "Spatial resolution of the primary beta-amyloidogenic process induced in postischemic hippocampus" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 21, 27. Mai 1994 (1994-05-27), Seiten 15253-15257, XP002182078 * Seite 15254 *	1-20	
A	ARAI T ET AL: "IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF AMYLOID BETA-PROTEIN WITH AMINO-TERMINAL ASPARTATE IN THE CEREBRAL CORTEX OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE" BRAIN RESEARCH, AMSTERDAM, NL, Bd. 823, Nr. 1/2, 1999, Seiten 202-206, XP001021822 ISSN: 0006-8993 * Seite 203 *	1-20	RESEARCHIERTE BACHGEBIETE (Int.Cl.7)  C07K G01N
A	WILTFANG J ET AL: "IMPROVED ELECTROPHORETIC SEPARATION AND IMMUNOBLOTTING OF BETA-AMYLOID (ABETA) PEPTIDES 1-40, 1-42, AND 1-43" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, Bd. 18, März 1997 (1997-03), Seiten 527-532, XP001021757 ISSN: 0173-0835 * das ganze Dokument *	3-19	
-/-			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>30. November 2001</b>	
		Prüfer <b>Wagner, R</b>	
KATEGORIE DER GENANNEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument A : technologischer Hintergrund O : richtungshaltige Offenbarung P : Zwischenliteratur	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		* Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 303 (2.8.97) (PAG.001)



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 01 11 4192--

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 7)
A	H.-W. KLAFFI ET AL: "Electrophoretic separation of beta-A4 Peptides (1-40) and (1-42)" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 237, 1996, Seiten 24-29, XP002182079 * das ganze Dokument *	3-18	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 30. November 2001	Prüfer Wagner, R
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschrittliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentsdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übernehmendes Dokument			

EPO FORM 1003 (03.01.96) (fr/eng)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.